

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

Dissertation

Nachweis Proteinkinase C abhängig exprimierter Gene in Astrozytomen

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Timm Schulz
aus Wuppertal

Dekan: Prof. Dr. Joachim Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Manfred Dietel
 2. Prof. Dr. Florian Überall
 3. Prof. Dr. Otmar Wiestler

Datum der Promotion: 19. September 2003

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	4
ABBILDUNGEN	7
DIAGRAMME	8
TABELLEN	9
ABKÜRZUNGEN	10
1 EINLEITUNG	12
1.1 Differentielle Genexpression	12
1.2 Proteinkinase C	12
1.3 PTHrP	14
1.4 Astrozytome, PKC und PTHrP	15
1.5 Supression Subtractive Hybridization	15
1.6 Fragestellung	16
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Material	17
2.1.1 Chemikalien, Hersteller und Bezugsquellen	17
2.1.2 Zelllinien	19
2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien	19
2.1.4 Verbrauchsmaterial	21
2.1.5 Geräte	21
2.1.6 Kits	22
2.1.7 Software	22
2.2 Methoden	23
2.2.1 Zellkultur	23
2.2.2 Behandlung der Zellen	24
2.2.3 RNA Arbeitsmethoden	25
2.2.4 PCR zur Selektion differentiell exprimierter Gene	26
2.2.5 Klonierung und Transformation	32
2.2.6 Sequenzierung	35

2.2.7	Radioaktive Northernblot-Analyse	36
2.2.8	Auswertung	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Kontrolluntersuchungen	39
3.1.1	Kontrolle der mRNA für die PCR-Select	39
3.1.2	Kontrolle des Rsa I Verdaus	40
3.1.3	Kontrolle der Adaptorligation	41
3.1.4	Kontrolle der PCR-Amplifikation	41
3.1.5	Kontrolle der Eco RI verdauten Plasmid-Inserts	42
3.2	Sequenzierung	44
3.2.1	Erläuterungen zu den Ergebnissen der Sequenzierungen	44
3.2.2	Erläuterungen zu den BLASTSearch Ergebnissen	45
3.2.3	Ergebnisse der Sequenzierung und Auswertung der Sequenzen	46
3.3	Radioaktive Northernblot-Analyse	63
3.3.1	Interleukin-8	65
3.3.2	Calpain	66
3.3.3	MHC-bindendes Protein 2	67
3.3.4	β_2-adrenerger Rezeptor	69
3.3.5	M-Phase Phosphoprotein-1 (MPP-1)	70
3.3.6	Cosmid F0811	71
3.3.7	ect2-Oncogen	72
3.3.8	Methionin-Adenosyltransferase alpha	74
3.3.9	PAC-Klon	75
3.3.10	ERM-Gen	76
3.3.11	PVT	77
3.3.12	Metallopanstimulin	78
3.3.13	Ornithin-Decarboxylase Antizym 2	79
3.3.14	Interferon-γ Rezeptor 2	81
3.3.15	Zusammenfassung der Ergebnisse der Northern-Blot-Kontrollen	82
4	DISKUSSION	84
4.1	Diskussion der angewandten Methoden	84
4.1.1	Generierung des Ausgangsmaterials für den PCR-Select-Assay	84
4.1.2	PCR-Select-Assay	86

4.1.3	Überprüfung und Auswertung der Ergebnisse der SSH	86
4.2	Diskussion der gefundenen Gene	92
4.2.1	Interleukin-8	92
4.2.2	Calpain	94
4.2.3	MHC-bindendes Protein 2	96
4.2.4	β_2-adrenerger Rezeptor	97
4.2.5	M-Phase Phosphoprotein-1	98
4.2.6	Cosmid F0811	99
4.2.7	ect2-Oncogen	99
4.2.8	Methionin-Adenosyltransferase alpha	99
4.2.9	PAC-Klon	101
4.2.10	ERM-Gen	101
4.2.11	PVT	103
4.2.12	Metallopanstimulin	103
4.2.13	Ornithin-Decarboxylase-Antizym 2	103
4.2.14	Interferon-γ Rezeptor 2	105
4.3	Bewertung und Zusammenfassung der Ergebnisse	107
5	ZUSAMMENFASSUNG	110
6	LITERATURVERZEICHNIS	112

Abbildungen

Abb. 1: Schematische Darstellung der PCR-Select cDNA Subtraktion	27
Abb. 2: pCR[®] 2.1 Vektor	33
Abb. 3: RNA-Kontrolle	39
Abb. 4: Kontrolle der RNA durch Aldolase RT-PCR	40
Abb. 5: Kontrolle Rsa I Verdau	40
Abb. 6: Ligationskontrolle	41
Abb. 7: Kontrolle der PCR-Amplifikation	42
Abb. 8: EcoRI verdaute Plasmid-Inserts	42
Abb. 9: EcoRI verdaute Plasmid-Inserts	43
Abb. 10: EcoRI verdaute Plasmid-Inserts	43
Abb. 11: EcoRI verdaute Plasmid-Inserts	43
Abb. 12: RNA-Kontroll-Gel	63
Abb. 13: Radioaktive Northernblot-Kontrolle	64
Abb. 14: PCR-Produkte für Sondenherstellung	64
Abb. 15: Radioaktiver Northernblot - Sonde IL-8	65
Abb. 16: Radioaktiver Northernblot - Sonde Calpain	66
Abb. 17: Radioaktiver Northernblot - Sonde MBP-2	68
Abb. 18: Radioaktiver Northernblot - Sonde β_2-adrenerger Rezeptor	69
Abb. 19: Radioaktiver Northernblot - Sonde MPP-1	70
Abb. 20: Radioaktiver Northernblot - Sonde Cosmid F0811	71
Abb. 21: Radioaktiver Northernblot - Sonde ect2-Oncogen	73
Abb. 22: Radioaktiver Northernblot - Sonde Methionine-Adenosyltransferase	74
Abb. 23: Radioaktiver Northernblot - Sonde PAC RP4-751E10	75
Abb. 24: Radioaktiver Northernblot - Sonde ERM-Gen	76
Abb. 25: Radioaktiver Northernblot - Sonde PVT	77
Abb. 26: Radioaktiver Northernblot - Sonde Metallopanstimulin	78
Abb. 27: Radioaktiver Northernblot - Sonde Ornithin-Decarboxylase Antizym 2	80
Abb. 28: Radioaktiver Northernblot - Sonde Interferon-γ Rezeptor 2	81
Abb. 29: Selbstlimitierende Regulation von Calpain und PKC	95
Abb. 30: Regulation des ERM-Faktors über die PKC	102
Abb. 31: Schema der Autoregulation von Antizyminen und Polyaminen	105
Abb. 32: Einfluß der PKC auf IFN-γ-R, AF-1 und MHC	107

Diagramme

Diagramm 1: Darstellung der Signalunterschiede IL-8. Zelllinie LN-405.	65
Diagramm 2: Darstellung der Signalunterschiede IL-8. Zelllinien LN-405, U-138, U-87 und GAMG.	66
Diagramm 3: Darstellung der Signalunterschiede Calpain. Zelllinie LN-405.	67
Diagramm 4: Darstellung der Signalunterschiede MBP-2. Zelllinie LN-405.	68
Diagramm 5: Darstellung der Signalunterschiede MBP-2. Zelllinien U-138 und U-87.	68
Diagramm 6: Darstellung der Signalunterschiede β_2-adrenerger Rezeptor. Zelllinie LN-405.	69
Diagramm 7: Darstellung der Signalunterschiede β_2-adrenerger Rezeptor. Zelllinien LN-405, U-138, U-87 und GAMG.	70
Diagramm 8: Darstellung der Signalunterschiede MPP-1. Zelllinie LN-405.	71
Diagramm 9: Darstellung der Signalunterschiede MPP-1. Zelllinien U-138, U-87 und GAMG.	71
Diagramm 10: Darstellung der Signalunterschiede Cosmid F0811. Zelllinie LN-405.	72
Diagramm 11: Darstellung der Signalunterschiede Cosmid F0811. Zelllinien U-138 und U-87.	72
Diagramm 12: Darstellung der Signalunterschiede ect2-Oncogen. Zelllinie LN-405.	73
Diagramm 13: Darstellung Signalunterschiede ect2-Oncogen. Zelllinien LN-405, U-138, U-87 und GAMG.	74
Diagramm 14: Darstellung der Signalunterschiede Methionine-Adenosyltransferase. Zelllinie LN-405.	75
Diagramm 15: Darstellung der Signalunterschiede PAC RP4-751E10. Zelllinie LN-405.	75
Diagramm 16: Darstellung der Signalunterschiede ERM-Gen. Zelllinie LN-405.	76
Diagramm 17: Darstellung der Signalunterschiede ERM-Gen. Zelllinien U-138, U-87, GAMG.	77
Diagramm 18: Darstellung der Signalunterschiede PVT. Zelllinie LN-405.	78
Diagramm 19: Darstellung der Signalunterschiede PVT. Zelllinien U-138, U-87 und GAMG.	78
Diagramm 20: Darstellung der Signalunterschiede Metallopanstimulin. Zelllinie LN-405.	79
Diagramm 21: Darstellung der Signalunterschiede Metallopanstimulin. Zelllinien U-138, U-87.	79
Diagramm 22: Darstellung der Signalunterschiede Ornithin-Decarboxylase Antizym 2. Zelllinie LN-405.	80
Diagramm 23: Darstellung der Signalunterschiede Ornithin-Decarboxylase Antizym 2. Zelllinien U-138 und U-87.	81
Diagramm 24: Darstellung der Signalunterschiede Interferon-γ Rezeptor 2. Zelllinie LN-405.	81
Diagramm 25: Darstellung der Signalunterschiede Interferon-γ Rezeptor 2. Zelllinien LN-405, U-138, U-87 und GAMG.	82

Tabellen

<u>Tabelle 1: Untersuchte Zelllinien mit histologischer Zuordnung und Bezugsquelle</u>	19
<u>Tabelle 2: Buchstabencode Sequenzauswertung</u>	44
<u>Tabelle 3: Auswertung der Signalunterschiede IL-8. Zellinie LN-405.</u>	65
<u>Tabelle 4: Auswertung der Signalunterschiede Calpain. Zellinie LN-405.</u>	67
<u>Tabelle 5: Auswertung der Signalunterschiede MBP-2. Zellinie LN-405.</u>	68
<u>Tabelle 6: Auswertung der Signalunterschiede β_2-adrenerger Rezeptor. Zellinie LN-405.</u>	69
<u>Tabelle 7: Auswertung der Signalunterschiede MPP-1. Zellinie LN-405.</u>	70
<u>Tabelle 8: Auswertung der Signalunterschiede Cosmid F0811. Zellinie LN-405.</u>	72
<u>Tabelle 9: Auswertung der Signalunterschiede ect2-Oncogen. Zellinie LN-405.</u>	73
<u>Tabelle 10: Auswertung der Signalunterschiede Methionine-Adenosyltransferase.</u> <u>Zellinie LN-405.</u>	74
<u>Tabelle 11: Auswertung der Signalunterschiede PAC RP4-751E10. Zellinie LN-405.</u>	75
<u>Tabelle 12: Auswertung der Signalunterschiede Erm-Gen. Zellinie LN-405.</u>	76
<u>Tabelle 13: Auswertung der Signalunterschiede PVT. Zellinie LN-405.</u>	77
<u>Tabelle 14: Auswertung der Signalunterschiede Metallopanstimulin. Zellinie LN-405.</u>	79
<u>Tabelle 15: Auswertung der Signalunterschiede Ornithin-Decarboxylase Antizym 2.</u> <u>Zellinie LN-405.</u>	80
<u>Tabelle 16: Auswertung der Signalunterschiede Interferon-γ Rezeptor 2. Zellinie LN-405.</u>	81
<u>Tabelle 17: Zusammenfassung der Ergebnisse der Northernblot-Kontrolle.</u>	83
<u>Tabelle 18: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse</u>	109

Abkürzungen

AF-1	akzessorischer Faktor 1
AP 1	13-0-tetradecanoylphorbol-13-acetat-responsive element
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	doppelt destilliert
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
β_2 AR	β_2 -adrenerger Rezeptor
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
Chel	Chelerythrin
DAG	Diacylglycerol
ddNTP	Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
EcoR I	Bezeichnung eines Restriktionsenzym
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
ERM	Ets-related molecule
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
G3PDH	Glycerinaldehyd-3phosphat Dehydrogenase
H.S.	Homo sapiens
H2TF1	H2 transcription factor 1
IE	Internationale Einheiten
IFN- γ -R	Interferon- γ -Rezeptor
IL-8	Interleukin-8
ips	Impulsrate pro Sekunde
kB	Kilo Basen
KBF-1	kappa-enhancer binding factor 1
kD	Kilo Dalton
LW	Leerwert

MAT	Methionin Adenosyltransferase
MBP-2	MHC-bindendes Protein 2
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, major histocompatibility complex
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPF	M-phase-promoting factor
MPP1	M-Phase Phosphoprotein 1
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
NaAc	Natriumacetat
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NH ₄ OAc	Ammoniumacetat
NP1 (2)	Nested-Primer 1 (2)
NSCLC	non-small cell lung cancer
ODC	Ornithindecaboxylase
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PEA3	Polyomavirus enhancer 3
PKC	Proteinkinase C
PTHrP	Parathormon-verwandtes Protein (parathyroid hormone-related protein)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
Rsa I	Restriktionsendonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
RW	Rohwert
SDS	Natrium-Dodecylhydrogensulfat
SSC	Saline-sodium citrate
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TPA	13-0-tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vol	Volumen
28S/18S	Sedimentationskoeffizient

1 Einleitung

1.1 Differentielle Genexpression

Die Informationen für die Synthese der Proteinmoleküle sowie für Wachstum und Teilung von Zellen werden in der DNA gespeichert. Die Informationseinheit bezeichnet man als Gen. Alle somatischen Zellen eines Organismus haben prinzipiell die gleiche DNA-Ausstattung. Zellen können allerdings ganz unterschiedliche Funktionen haben (Muskelzellen, Leberzellen, Nervenzellen u.v.a.), sich in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befinden (Replikationsphase, Transkriptionsphase, Phase der Proteinsynthese) oder verschiedene Phasen der Zelldifferenzierung durchlaufen. Auch exogene Faktoren (Hormone) können Einfluß auf die Funktionen der Zelle ausüben, wie z.B. die Steigerung der Proteinsynthese durch Schilddrüsenhormon. Daraus ergibt sich, daß ganz unterschiedliche Informationen benötigt werden, also spezifische Gene an- oder abgeschaltet werden (Löffler und Petrides 1990).

Um Aussagen über die Regulation und Funktion von Genen zu erhalten, kann man Gewebe oder Zellen hinsichtlich der transkribierten Gene vergleichend untersuchen. Die Zellen lassen sich dabei durch ihre Art (Muskel- oder Nervenzelle), ihren Differenzierungsgrad (Embryonalzelle oder adulte Zelle), ihre Dignität (nicht maligne oder maligne) oder durch äußere Einflüsse (z.B. physikalische/chemische Bedingungen oder Einfluß von Hormonen) voneinander abgrenzen.

1.2 Proteinkinase C

Proteinkinase C ist eine Familie von Serin-/Threoninkinasen und umfaßt wenigstens 12 Isoformen, die sich in Struktur und enzymatischer Aktivität unterscheiden. Gemeinsam ist allen aus einer einzelsträngigen Polypeptidketten bestehenden Isoformen eine feststehende (C1-C4) und eine variable (V1-V5) Region. Funktionell bestehen sie aus einer katalytischen und einer regulatorischen Domäne. Eingeteilt werden die Isoformen in drei Gruppen. Die erste Gruppe, die klassischen PKC-Isoformen (cPKCs), umfaßt die durch Ca^{2+} , Phosphatidylserin und DAG aktivierbaren. Die zweite Gruppe, die neuen PKC-Isoformen (nPKCs), beinhaltet die durch Phosphatidylserin und DAG aber nicht durch Ca^{2+} aktivierbaren und die dritte Gruppe, die atypischen PKC-Isoformen (aPKCs), umfaßt die nur durch Phosphatidylserin, nicht aber durch Ca^{2+} und DAG, aktivierbaren (Buchner 1995). Die unterschiedliche Verteilung der einzelnen Isoenzyme in den Geweben und die Vielzahl der Liganden wie Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren, die zu einer PKC-Aktivierung führen (Azzì et al. 1992), zeigen an, daß die PKC-Familie in unterschiedlichste Reaktionen involviert ist. So wird der PKC-Familie eine zentrale regulatorische Rolle in einer Vielzahl zellulärer Prozesse zugeschrieben, wie Proliferation, Beeinflussung des Zellzyklus,

Differenzierung, Kontrolle von Genexpression, Apoptose, Umbildung des Cytoskelets, Modulation von Ionenkanälen und Sekretion zellulärer Produkte (Nishizuka 1992, Dekker und Parker 1994).

Die PKC besitzt eine hohe Affinität für den Tumorpromotor TPA (13-0-tetradecanoylphorbol-13-acetat) und wird durch diesen direkt aktiviert (Castagna et al. 1982, Ashendel 1985). Es konnte gezeigt werden, daß eine enge Korrelation zwischen der PKC-Aktivität und der Proliferationsrate humaner Astrozyten besteht (Baltuch et al. 1995) und die PKC-Aktivität eine Veränderung der Zellmorphologie von Astrozyten bewirkt (Mobley et al. 1986). Die PKC-Aktivität ist in Zelllinien maligner Gliome signifikant höher als in nicht malignen Vergleichslinien (Couldwell et al. 1991). Die Aktivierung der PKC durch TPA und die daraus resultierenden Veränderungen der Zelle zeigen ihre direkte Rolle für die Wachstumskontrolle und in der Regulierung von Proliferation und Differenzierung (Clemens et al. 1992, Yong 1992). Zahlreiche TPA-induzierte Gene, bzw. Proteine, konnten bisher nachgewiesen werden. Dazu gehören Protoonkogene (c-myc, c-fos, c-sis, c-fms, pro-1, SV40), Wachstumsmodulatoren (Ornithin-Decarboxylase, Prolactin, MRP-Proliferin, PDGF, EGF, VEGF, Interleukin-1, Interleukin-6, Interleukin-8, T-Cell growth factor, BSF-Interferon B2, Interferon-erythroid potentiating activator), Protease-Modulatoren (Plasminogen activator, MEP-Lysosomal protein, Stromelysin, Collagenase, Metalloproteinase-Inhibitor), Proteine des Cytoskeletts (Actin, Vimentin) und andere Proteine (Metallothionein, Transglutaminase, Calcitonin, Calpain) (Imbra und Karin 1986, Johnson et al. 1987, Angel et al. 1987, Finkenzeller et al. 1992, Hata et al. 1992, Gross et al. 1993, Martinez-Lacaci und Dickson 1996).

Es konnte gezeigt werden, daß die Veränderung der Genexpression TPA-behandelter Zellen durch eine Kaskade von Ereignissen hervorgerufen wird, an deren Anfang die PKC-Aktivierung steht (Nishizuka 1984, Johnson et al. 1987, Angel et al. 1987, Hata et al. 1989).

Für die Regulierung der Transkription spezifischer Gene durch die PKC werden derzeit mindestens zwei Erklärungsmodelle diskutiert. Zum einen könnte die Aktivierung der PKC zur Phosphorylierung von Proteinen führen, die dann in den Nucleus translozieren und dort die Transkription spezifischer Gene aktivieren. Dieser Weg kann die Aktivierung der Ras, Ras-1 und MAP-Kinase beinhalten (Avruch et al. 1994, Yamaguchi et al. 1995). Das andere Modell beschreibt eine Translokation der PKC (oder Teile des Enzyms) in den Nucleus, bzw. die Aktivierung nucleärer PKC. Im Nucleus phosphoryliert die PKC dann Proteine, die ihre DNA-Bindungen oder ihre regulatorischen Eigenschaften ändern und so eine Transkription auslösen. So konnten z.B. das Tumor-Suppressor-Gen p53, die DNA-Topoisomerase und die DNA-Polymerase als PKC-Substrate identifiziert werden (Buchner 1995, Hucho und Buchner 1997). Allerdings gibt es weder für das erste noch für das zweite Modell endgültig gesicherte Erkenntnisse. Da die Aktivierung der PKC durch andere Aktivatoren, wie z.B. Bryostatin, nicht dieselben Auswirkungen auf die Zellen hat oder

der Effekt von TPA durch PKC-Inhibitoren nicht vollständig blockiert werden konnte, wird angenommen, daß die Aktivierung der PKC nach TPA-Behandlung ein notwendiger aber nicht allein ausreichender Schritt ist, die Transkription spezifischer Gene zu erklären (Johnson et al. 1987). Die Vielzahl der Aktivierungsmöglichkeiten, die große Zahl von Isoformen, deren unterschiedliche Verteilungsmuster in den Geweben und die Möglichkeiten der transkriptionsauslösenden Wege sprechen dafür, daß die Steuerung der Genexpression über die PKC sehr differenziert erfolgt.

1.3 PTHrP

Das Parathormon-verwandte Peptid wurde erstmals 1987 in Tumoren, die im Zusammenhang mit der tumor-assoziierten Hypercalcaemie (HHM, humoral hypercalcemia of malignancy) stehen, identifiziert und für die HHM verantwortlich gemacht (Moseley et al. 1987). Inzwischen wurde PTHrP in der Mehrheit aller Gewebe während der Fetal-Periode und der ausgereiften Periode nachgewiesen. Es wird ihm eine Rolle in der Regulation des Tonus glatter Muskulatur, des transepithelialen Calcium-Transports und der Entwicklung, der Differenzierung und der Proliferation von Organen und Geweben zugeschrieben (Orloff et al. 1994, Philbrick 1996).

Das PTHrP-Gen liegt auf Chromosom 12 (Martin und Suva, 1988). Nach alternativem Splicing werden drei Transkriptionsprodukte gebildet, die zu drei verschiedenen Translationsprodukten übersetzt werden. Diese sind 139, 141 und 173 Aminosäuren lang und werden posttranslational prozessiert, so daß es zu unterschiedlichen Sekretionsprodukten kommt (Orloff et al. 1994, Philbrick et al. 1996). PTHrP kann dabei in Form von sekretorischer Granula sezerniert werden, z.B. von Inselzellen im Pankreas und Hypophysenzellen (Plawner et al. 1995), oder als para- und/oder autokriner Faktor vorkommen (Burton et al. 1990, Struckhof und Turzynski 1994). Die postrtranslationale Prozessierung führt zu einer Vielzahl sekretorischer Formen, welche jeweils unterschiedliche Rezeptoren haben. So kann die Bindung an den PTHrP/PTH-Rezeptor (aus der Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren) erfolgen und eine der von PTH hervorgerufenen vergleichbare Wirkung nach sich ziehen; es kann aber auch die Adenylatzyklase oder Phospholipase C aktiviert werden (Guo et al. 1995). Welcher Weg beschritten wird, hängt dabei von der Ausstattung der Zellen mit unterschiedlichen G-Proteinen und der Rezeptordichte zusammen (Whitfield et al. 1992, Guo et al. 1995).

Ein weiteres durch PTHrP aktivierbares Enzym ist die PKC (Whitfield et al. 1992, 1994, 1996, Gagnon et al. 1993). Ein Effekt der PKC-Aktivierung durch PTHrP scheint dabei die Stimulierung der DNA-Synthese zu sein, wie mehrere Arbeitsgruppen zeigen konnten (Sugimoto et al. 1993, Garcia-Ocana et al. 1998, Villanueva-Penacarrillo et al. 1999).

In einem Nebenversuch soll der Frage nachgegangen werden, ob auch PTHrP dieselben Gene induziert wie die durch TPA aktivierte PKC.

1.4 Astrozytome, PKC und PTHrP

Das hohe Expressionsniveau der PKC in Hirngewebe weist auf die Bedeutung des Enzyms für die normalen Funktionen der Zellen des zentralen Nervensystems hin (Tanka und Nishizuka 1994, Wetsel et al. 1992). Maligne Gliazellen haben eine sehr hohe PKC-Enzymaktivität, die mit der Wachstumsgeschwindigkeit korreliert (Couldwell et al. 1991, Yong 1992). Die Proliferationsrate von Gliazellen kann durch PKC-Inhibition, z.B. mit Staurosporin, um über 90% reduziert werden (Baltuch et al. 1993).

Diese hohe PKC-Aktivität scheint insbesondere in Gliatumoren durchgängig vorzuliegen, wohingegen andere, nicht gliale Tumore, dieses Merkmal nicht zeigen (Baltuch et al. 1993).

Da also das maligne Wachstum von Gliazellen in besonderer Weise von der PKC beeinflusst wird, scheint es sinnvoll zu sein, den Einfluß der aktivierten PKC auf die Genexpression in Astrozytomzelllinien zu untersuchen, weil sich hier besonders deutliche Expressionsunterschiede herausstellen lassen sollten.

Auch PTHrP wird eine wichtige Rolle im Nervengewebe zugeschrieben, u.a. wird seine Rolle als Wachstums- und Differenzierungsfaktor in Astrozyten diskutiert (Hashimoto et al. 1994, Philbrick et al. 1996). Hierbei spielt sowohl eine parakrine meningo-astrozytäre, als auch eine autokrine astrozytäre Schleife eine Rolle, da PTHrP in meningealen und astrozytären Zellen gebildet wird, der Rezeptor für PTHrP nur in den astrozytären, nicht aber in den meningealen Zellen zu finden ist (Struckhoff und Turzynski, 1995).

1.5 Supression Subtractive Hybridization

Die „Supression subtractive hybridization“ (SSH) ist eine 1996 erstmals beschriebene Methode zur Herstellung voneinander subtrahierter cDNA-Bibliotheken und ist entwickelt worden, um bei Krankheiten, in der Entwicklung, gewebespezifisch oder auf anderem Wege, differentiell exprimierte Gene zu finden (Diatschenko et al. 1996).

Bisherige Methoden wie „differential display“ (Liang und Pardee 1992), „representational difference analysis“ (Lisitsyn et al. 1993), „enzymatic degradation subtraction“ (Zeng J. et al. 1994) und andere haben den Nachteil, daß selten exprimierte Gene häufig nicht ausfindig gemacht werden können. Da aber die Gene der Regulatorproteine in die Gruppe der selten exprimierten Gene fallen, verdient gerade diese Gruppe ein besonderes Interesse.

Die neue Methode (SSH) soll die gesuchten (differentiell exprimierten Gene) cDNA-Fragmente selektiv vervielfältigen, gleichzeitig die nicht gesuchten unterdrücken und außerdem den quantitativen Unterschied zwischen selten und häufig exprimierten Genen ausgleichen.

Die Methode basiert auf folgenden Schritten: Zunächst werden die zu vergleichenden mRNA-Populationen in cDNA umgeschrieben, woraufhin eine Hybridisierung der in beiden Populationen vorkommenden Fragmente erfolgt. Diese werden dann verworfen, so daß diejenigen, unhybridisierten, cDNA-Fragmente übrigbleiben, die nur in einer der beiden Populationen vorkommen. Ein wichtiger Bestandteil der SSH ist das Prinzip der „Supression PCR“ (Siebert et al. 1995, Lukyanov et al. 1995), bei dem unerwünschte Fragmente durch Schleifenbildung unterdrückt werden. Zusätzlich wird der Häufigkeitsunterschied der Fragmente in einem weiteren Hybridisationsschritt ausgeglichen, d.h. selten exprimierte Abschnitte werden etwa um den Faktor 1000 (Diatschenko et al. 1996, Wong et al. 1996) verstärkt, so daß sowohl wenig als auch häufig exprimierte Gene gefunden werden können.

1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen bearbeitet werden:

- Lassen sich mit Hilfe der SSH-Methode in einer Astrozytomzelllinie kurzfristig regulierte Gene nach Stimulierung der PKC durch TPA nachweisen?
- Werden gefundene Gene auch in anderen Astrozytomzelllinien differentiell exprimiert?
- Werden die gefundenen Gene auch über den möglichen Weg einer PKC-Aktivierung durch PTHrP differentiell exprimiert?
- Ist die differentielle Expression der gefundenen Gene nach PKC-Stimulierung bekannt oder unbekannt?
- Wie lassen sich diese Gene in einen Zusammenhang mit der Tumorpromotion nach PKC-Stimulierung durch TPA bringen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Hersteller und Bezugsquellen

Alle verwendeten Chemikalien genügten dem Reinheitsgrad pro analysis.

Alle fertigen Lösungen und Materialien aus den verwendeten Kits werden im Methodenteil aufgeführt.

[α -³²P]dCTP (110 TBq/mmol), Amersham, Braunschweig

ϕX147/Hae III Marker, Life Technologies, Eggstein

10x KlenTaq PCR reaction buffer, Clontech, Palo Alto, USA

50x KlenTaq Polymerase Mix, Clontech, Palo Alto, USA

Agarose, GibcoBRL, Karlsruhe

Aldolase-Primer, Pharmacia, Freiburg

Ammoniumacetat, Merck, Darmstadt

Ampicillin, D[-]- α -Aminobenzylpenizillin, Sigma, Deisenhofen

APS (Ammoniumperoxidisulfat), Merck, Darmstadt

Bacto Agar, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bacto Trypton, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bacto Yeast Extract, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Borsäure, Merck, Darmstadt

Bromphenolblau (3', 3'', 5', 5''-Tetrabromophenolsulfonphtalein), Sigma, München

BSA (bovine serum albumin, Fraktion V), Serva, Heidelberg

Chelerythrinchlorid, Biotrend, Köln

Chloroform, Merck, Darmstadt

DMSO (Dimethylsulfoxid), Sigma, München

DNA-Molekulargewichtsmarker X, Boehringer, Mannheim

dNTP Mix, Clontech, Palo Alto, USA

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz), Boehringer, Mannheim

Eisessig, Merck, Darmstadt

Essigsäure, Merck, Darmstadt

Ethanol, Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid, Sigma, München

FCS (fetal calf serum), PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
 Fetuin, Sigma, München
 Formaldehyd, Merck, Darmstadt
 Formamid, Merck, Darmstadt
 Glukose, Sigma, München
 Glykogen, Boehringer, Mannheim
 Glycerin, Merck, Darmstadt
 Guanidiniumthiocyanat, Life Technologies, Eggenstein
 Harnstoff, Serva, Heidelberg
 H-Insulin, Hoechst, Frankfurt am Main
 Isoamylalkohol, Merck, Darmstadt
 Isopropanol, Merck, Darmstadt
 Lachssperm-DNA, Stratagene, Heidelberg
 L-Glutamin, Bio Whittaker, Verviers, Belgien
 Lithiumchlorid, Merck, Darmstadt
 Loading-Dye, Promega, Mannheim
 MEM-Vitamine, Seromed, Berlin
 Methanol, Merck, Darmstadt
 MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure), Sigma, München
 Natriumacetat-Trihydrat, Merck, Darmstadt
 Natriumbicarbonat (7,5 % Lösung), Seromed, Biochrom, Berlin
 Natriumchlorid, Merck, Darmstadt
 Oligo(dT)-Cellulose, Boehringer, Mannheim
 PBS, steril für Zellkultur, Sigma, München
 Phenol, Sigma, München
 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1), Sigma, Deisenhofen
 PTHrP(1-34): PTHrP(1-34)amid, Bachem, Heidelberg
 QuikHyb Hybridization Solution, Stratagene, Heidelberg
 Restriktionsendonuklease: Eco RI, Boehringer, Mannheim
 Sarcosyl (N-Lauroylsarkosin, Natriumsalz), Serva, Heidelberg
 SDS (Natrium-Dodecylhydrogensulfat), Merck, Darmstadt
 Sequagel buffer, Biozym, Hamburg
 Sequagel XR, 6%, Biozym, Hamburg
 β-Mercaptoethanol, Merck, Darmstadt

Stammlösung Nr.33258, Hoechst, Frankfurt am Main

TPA (12-0-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat), Serva, Heidelberg

Transferrin, Boehringer, Mannheim

Trasyol, Bayer, Leverkusen

Tri-Natriumcitrat, Merck, Darmstadt

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Merck, Darmstadt

Tris-Base (Trisaminomethan), Merck, Darmstadt

Trypsin, Seromed, Biochrom, Berlin

2.1.2 Zelllinien

Tabelle 1: Untersuchte Zelllinien mit histologischer Zuordnung und Bezugsquelle

Linie	Ursprung	Bezugsquelle
LN-405	Astrozytom Grad 4	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DMSZ), Braunschweig
GAMG	Astrozytom Grad 4	DMSZ
U-138 MG	Astrozytom Grad 4	DMSZ
U-87 MG	Astrozytom Grad 3	DMSZ

2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

Leibovitz' L-15 Medium, Life Technologies, Eggenstein

(Zusätze: 10% FCS, 1 mM Glutamin, einmal MEM-Vitamine, 6,25 mg/l Fetuin, 1 µg/ml Transferrin, 0,1% Glucose, 80 IE/l Insulin, 20.000 KIE/l Trasyol und 0,1125% NaCO₃)

Lysispuffer: 4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat pH 7, 0,1 M β-Mercaptoethanol, 0,5% Sarcosyl

50mal TAE-Puffer: 2,25 M Tris-Base
5,71 % Eisessig
50 mM EDTA, pH 8,0

10mal TBE: 162,0 g Tris Base
27,5 g Borsäure
9,5 g EDTA
auf 1 l H₂O

25mal MOPS:	1 M MOPS, pH 7 250 mM Natriumacetat 25 mM EDTA
RNA-Auftragspuffer:	500 µl Formamid 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) 1 µl 0,5 M EDTA, pH 8 10 mg Bromphenolblau
DNA-Auftragspuffer:	10% Glyzerin 100 µg/ml Ethidiumbromid
20mal SSC:	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
Tris-HCL:	1 M Tris-Base mit 1 M HCl auf pH 7,5 eingestellt
LB-Medium:	1,0% Tryptone 0,5% Yeast Extract 1,0% NaCl auf pH 7,0 eingestellt
mRNA Isolation:	2mal Bindungspuffer: 4 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,5 12,5 ml 8 M LiCl 0,4 ml 0,5 M EDTA 1 ml 20% SDS 82,1 ml H ₂ O
Waschpuffer:	2 ml 1 M Tris/HCl 1,25 ml 8 M LiCl 0,2 ml 0,5 M EDTA 0,5 ml 20% SDS 96 ml H ₂ O

Elutionspuffer:	1 ml 1 M Tris/HCl
	0,2 ml 0,5 M EDTA
	0,25 ml 20% SDS
	98,5 ml H ₂ O

2.1.4 Verbrauchsmaterial

8-Kammer-Objekträger, Nunc, Wiesbaden-Biebrich

Zellkulturflaschen, 175 cm², Falcon, Becton und Dickinson, Heidelberg

Nitrocellulose Transfer Membran, Schleicher & Schuell, Dassel

Whatmann-Papier, Gel Blotting Papier GB002, Schleicher & Schuell, Dassel

Hyperfilm-MP, Amersham, Braunschweig

Spin-column, Boehringer, Mannheim

2.1.5 Geräte

Zentrifugen:	Centrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg
	Beckman J2-MC, Beckman Instruments, Palo Alto, USA
	Beckman GS-6KR, Beckman Instruments, Palo Alto, USA
Photometer:	RNA/DNA Calculator Gene Quant II, Pharmacia, Freiburg
Thermocycler:	Trio-Thermoblock, Biometra, Göttingen
UV-Transluminator:	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch
Phosphordensitometer:	Molecular Imager Model GS-250, Biorad, München (Zubehör: GS-250 Sample Loading Dock, Molecular Imaging Screens-BI, GS-250 Screen Eraser)
Scanner:	Imaging Densitometer, Biorad, München
Röntgenfilmentwickler:	Hyperprocessor Automatic Film Processor RPN 1700, Amersham, Braunschweig
Rotationsofen:	Compact Line 0V4, Biometra, Göttingen
Wärmeblock:	Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Sequenzierer:	Analyser, Gene Reading 4200, Li-Cor, Inc., Lincoln, Nebraska, USA

2.1.6 Kits

High Pure PCR Product Purification Kit, Boehringer, Mannheim

TA Cloning Kit, Invitrogen, NV Leek, Holland

Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (RPN2438), Amersham, Braunschweig

Clontech PCR-Select cDNA Subtractions Kit, Clontech, Palo Alto, USA

QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen GmbH, Hilden

Megaprime™ DNA labelling systems, RPN 1604, Amersham, Braunschweig

1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV), Boehringer, Mannheim

2.1.7 Software

Molecular Analyst, BioRad, München

- densitometrisches Messen radioaktiv markierter Banden
- Erzeugen von Bilddateien (Format: IMG, TIF)

Microsoft Powerpoint, Microsoft Corporation

- Zusammenstellung des Bildmaterials (Format: PPT)
- Beschriften der Bilder

Microsoft Excel, Microsoft Corporation

- Auswertung der Signalunterschiede
- Erstellung von Diagrammen

Base Image JR™, Version 4., Li-Cor, Inc., Lincoln, Nebraska, USA

- Sequenzierung und Auswertung

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierte Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurde mit humanen Zelllinien von Astrozytomen gearbeitet. Alle in den Versuchen verwendeten Astrozytomzelllinien wurden auf das Vorhandensein des für die Wirkung von PTHrP notwendigen Rezeptors getestet und haben sowohl diesen, als auch die mRNA für PTHrP exprimiert (Bunge 1997). Die als Ausgangsmaterial für den PCR-Select-Assay verwendete mRNA wurde von der Linie LN-405 gewonnen, da sie die höchsten Ausbeuten an RNA (350-500 µg/175 cm²-Flasche) lieferte. Alle vier im Methodenteil aufgeführten Zelllinien lieferten die RNA für die Northernblot-Kontrollen.

2.2.1.2 Kultivierung und Passagierung der Zellen

Die Zellen wuchsen in 175 cm²-Zellkulturflaschen (Falcon) bei 5% CO₂, 37 °C und 98% Luftfeuchtigkeit. Das Passagieren erfolgte zweimal in der Woche. Nach Entfernung des alten Kulturmediums, Leibovitz' L-15, wurden die Zellen mit 5 ml sterilem PBS gespült. Anschließend erfolgte eine nur wenige Minuten dauernde Behandlung der Zellen mit 3-4 ml Trypsin bei 37 °C bis zur vollständigen Ablösung von der Flasche. Je nach Zelldichte wurde ein Teil der Zellen entfernt, so daß aus dem Rest der Zellen in der Flasche ein konfluentes Zellwachstum bis zur nächsten Passage resultierte. Danach wurde die Flasche wieder mit Medium, Leibovitz' L-15 (35 ml), aufgefüllt. Die entnommenen Zellen wurden für die weiteren Versuche verwendet.

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die nur bis ca. 90% konfluent gewachsenen Zellen wurden trypsiniert (2.2.1.2), dann in kaltem Standardmedium (Leibovitz' L-15) aufgenommen und bei ca. 1.200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend konnte das Medium abgezogen werden. Danach wurde das Pellet zunächst in 1 ml Einfriermedium (Standardmedium + 5% DMSO) aufgenommen und auf die gewünschte Zellzahl verdünnt (Zellzahl pro Einfrier Röhrchen: 1-7 x 10⁶). Die Einfrierampullen (Nunc) wurden in einer NALGENE-Einfrierbox mit einer Abkühlrate von 1 °C pro Minute auf -80 °C heruntergekühlt und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die angetauten Zellen aus den Einfrierampullen bei 37 °C in die vorbereiteten Kulturflaschen überführt. Nach erfolgreicher Anheftung, spätestens jedoch nach 12 Stunden, erfolgte ein Wechsel des Mediums, um das restliche DMSO, welches aus dem Einfriermedium stammt, zu entfernen.

2.2.1.4 Mycoplasmentest

Um störende Infektionen durch Mycoplasmen zu verhindern, wurden die Zellen regelmäßig untersucht und bei Befall durch eine neu aufgetaute Passage ersetzt. Hierzu wurde der Hoechst-Farbstoff (Stocklösung Nr. 33258) benutzt. Dieser bindet sowohl an der DNA des Zellkerns als auch an der DNA der Mycoplasmen, so daß in der morphologischen Untersuchung die zytoplasmatisch lokalisierte DNA der Mycoplasmen erkennbar wird.

Die Zellen wurden bei einer Passage auf einem 8-Kammer-Objektträger unter sterilen Bedingungen kultiviert. Bei optimaler Zelldichte wurden die Zellen für 10 min in die Fixierlösung (drei Teile Methanol, ein Teil Essigsäure) gelegt. Nach Entfernung der Fixierlösung trockneten die Zellen 10-15 min bei 55-60 °C im Ofen. Zur Färbung wurde dann ein Tropfen der Hoechst-Lösung Nr. 33258 (0,5 µg/ml) auf die Zellen getropft und 10 min bei RT auf den Zellen belassen. Daraufhin konnten die Zellen dreimal mit dest. H₂O gespült und eingedeckelt werden. Die Untersuchung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop bei Anregung unter UV-Licht.

2.2.2 Behandlung der Zellen

2.2.2.1 Behandlung der Zellkulturen für den PCR-Select-Assay

Um störende Einflüsse durch das Serum, dessen Zusammensetzung sich chargenabhängig ändert, zu verhindern, wurde die Zellbehandlung serumfrei durchgeführt. Das L15-Medium (1 Liter) enthielt lediglich folgende Zusätze: 7,5 ml Natriumbicarbonat (7,5%ige Lösung), 40 IE Insulin, 0,1% BSA und 5 ml Glutamin.

Der Zellrasen wurde zweimal mit 5 ml serumfreiem Medium gewaschen und das alte Medium durch 30 ml serumfreies Medium ersetzt. Jeweils zwei Flaschen wurden mit 3,7 µl TPA (Endkonzentration 10 nM), bzw. 6 µl Chelerythrin (Endkonzentration 2 µM) vier Stunden behandelt.

2.2.2.2 Ausgangsmaterial für radioaktive Northernblot-Kontrolle

Auch hier wurde wieder mit serumfreiem Medium gearbeitet (s.o.). Die Konzentrationen entsprachen den oben genannten, für PTHrP betrug sie 10⁻⁹ M. Je eine Zellkulturflasche (175 cm²) LN-405 wurde 30, 60, 120, 240 und 480 min mit TPA, je eine Flasche 240 min mit Chelerythrin, bzw. PTHrP behandelt und eine Flasche blieb unbehandelt. Die drei anderen Zelllinien (GAMG, U-87, U-138) wurden 240 min mit TPA, bzw. Chelerythrin behandelt, eine Kulturflasche blieb wiederum unbehandelt.

2.2.3 RNA Arbeitsmethoden

2.2.3.1 RNA-Isolation

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach der Guanidiniumthiocyanat-Methode (Chomczynski und Sacchi 1987).

Die in den Kulturflaschen (T175) konfluent gewachsenen Zellen wurden in 2 ml Lysispuffer (4 M Guanidiniumthiocyanat, 25 mM Natriumcitrat pH 7, 0,1 M β -Mercaptoethanol, 0,5% Sarcosyl) aufgenommen und in Polypropylenröhrchen (Falcon, Becton and Dickinson, Heidelberg) überführt. Nach Zugabe von 0,1 ml NaAc (2 M, pH 4), 1 ml Phenol und 0,2 ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1 gemischt) und kräftigem Vortexen wurden die Proben 15 min auf Eis inkubiert, anschließend für 20 min bei 4 °C mit 3700 rpm zentrifugiert. Die oberste, RNA enthaltende Phase, wurde vorsichtig in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, mit Isopropanol im Verhältnis 1:1 gemischt und für eine Stunde bei -20 °C gefällt. Danach wurde die Probe für 30 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert, die Flüssigkeit abgegossen und das Pellet in 300 μ l Lysispuffer resuspendiert und erneut mit dem gleichen Volumen an Isopropanol bei 20 °C für eine Stunde gefällt. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit 75% Ethanol gewaschen, die RNA in H₂O aufgenommen und die Konzentration und Reinheit im Photometer (Genequant 11, Pharmacia, Freiburg) bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Daraufhin konnten die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C aufbewahrt werden.

2.2.3.2 mRNA-Isolation

Die mRNA-Isolation zur Gewinnung der poly-A⁺-mRNA als Ausgangsmaterial für die „Supression subtractive hybridization“ (SSH) wurde mit oligo(dT)-Zellulose durchgeführt.

Zuerst mußte die oligo(dT)-Zellulose in einmal Bindungspuffer für die Dauer von einer Stunde bei 4 °C quellen. Nach kurzer Zentrifugation wurde dann der Überstand abgegossen und der Zellulose 0,1 M NaOH zugegeben. Die Zellulose konnte anschließend dreimal mit H₂O gewaschen und dann mit einmal Bindungspuffer equilibriert werden.

Die RNA wurde in 500 μ l H₂O aufgenommen, bei 65 °C 5 min denaturiert und auf Eis abgekühlt. Danach kam die zweifache Menge an Bindungspuffer dazu. Der Ansatz wurde über die in die vorbereiteten Säulen überführte Zellulose gegeben. Das erste Eluat wurde aufgefangen, 5 min auf 65 °C erhitzt und ein weiteres Mal über die Zellulose gegeben. Dieses Eluat wurde zur Kontrolle aufbewahrt. Dann wurde die Säule mit einmal Bindungspuffer gewaschen, bis die optische Dichte im Eluat $\leq 0,02 A_{260}$ betrug. Daraufhin wurde die Säule mit Waschpuffer gewaschen, bis die optische Dichte im Eluat $\leq 0,06 A_{260}$ betrug. Die mRNA konnte anschließend mit 1 ml Elutionspuffer eluiert und aufgefangen werden. Davon wurden 100 μ l abgenommen und die Konzentration anhand der

optischen Dichte bestimmt. Der Rest wurde mit 3 M NaOH und Ethanol bei -20 °C über Nacht gefällt.

2.2.4 PCR zur Selektion differentiell exprimierter Gene

Mit dem PCR-Select Kit (Clontech) können differentiell exprimierte Gene, d.h. diejenigen Gene, die nur in einer von zwei zu vergleichenden Populationen mRNA vorhanden sind, erkannt werden. Das Prinzip beruht darauf, daß, nach dem Umschreiben der mRNA in cDNA, beide Populationen hybridisiert werden und danach die hybridisierten, in beiden Populationen vorkommenden Sequenzen verworfen werden. Bei den unhybridisierten Sequenzen handelt es sich um diejenigen Gene, die nur in einer Population vorkommen.

Zunächst wird die von der poly-A⁺-mRNA synthetisierte cDNA mit Rsa I verdaut, wobei freie Enden entstehen. Im Folgenden wird die zu untersuchende cDNA-Population als Tester, die als Vergleich dienende als Driver bezeichnet. Die Tester-cDNA wird in zwei Proben aufgeteilt und mit unterschiedlichen Adaptoren ligiert. Dabei haben die Enden der Adaptoren keine Phosphatgruppe, so daß nur ein Strang der Adaptoren an das 5' Ende der Proben bindet. Die Adaptoren haben spezifische Abschnitte, an denen die PCR-Primer binden können. Dann werden zwei Hybridisierungen vorgenommen. In der ersten wird ein Überschuß an Driver zu jeder der beiden Testerproben gegeben. Hierbei entstehen verschiedene Produkte: einzelsträngige Tester, Hybride von zwei Testern, Hybride von Tester mit Driver, Hybride mit zwei Drivern und einzelsträngige Driver. Da für die häufiger auftretenden Moleküle die Reannealing-Zeit kürzer ist, gleichen sich die Konzentrationen der häufiger und weniger vorhandenen Gene an. Gleichzeitig reichern sich einzelsträngige differentiell exprimierte Tester an, da nicht differentiell exprimierte Tester mit den Drivern hybridisieren. In der zweiten Hybridisierung werden, ohne die Proben vorher zu denaturieren, beide Ansätze gemischt. Nun können nur die einzelsträngigen Tester hybridisieren, so daß doppelsträngige Tester-Moleküle mit unterschiedlichen Enden (Adaptor 1 und 2) entstehen. Nochmals wird Driver dazugegeben, so daß die differentiellen Abschnitte angereichert werden. Nach Auffüllen der Enden durch DNA-Polymerase haben die hybridisierten Tester-Moleküle zwei unterschiedliche Enden, die als Bindungsstelle für die Nested-Primer dienen.

Danach erfolgt eine PCR, in der nur diejenigen Moleküle amplifiziert werden, die entweder Hybride mit zwei unterschiedlichen Adaptoren oder Hybride mit den gleichen Adaptoren sind. Dabei werden die Moleküle mit zwei unterschiedlichen Adaptoren exponentiell amplifiziert, die Moleküle mit einem Adaptor linear. Daraufhin erfolgt eine weitere PCR, um den Hintergrund zu verringern und die differentiell exprimierten Abschnitte weiter anzureichern.

Die Proben können nun kloniert und weiter untersucht werden.

Die schematische Darstellung soll die Abfolge der SSH mit ihren unterschiedlichen Produkten verdeutlichen.

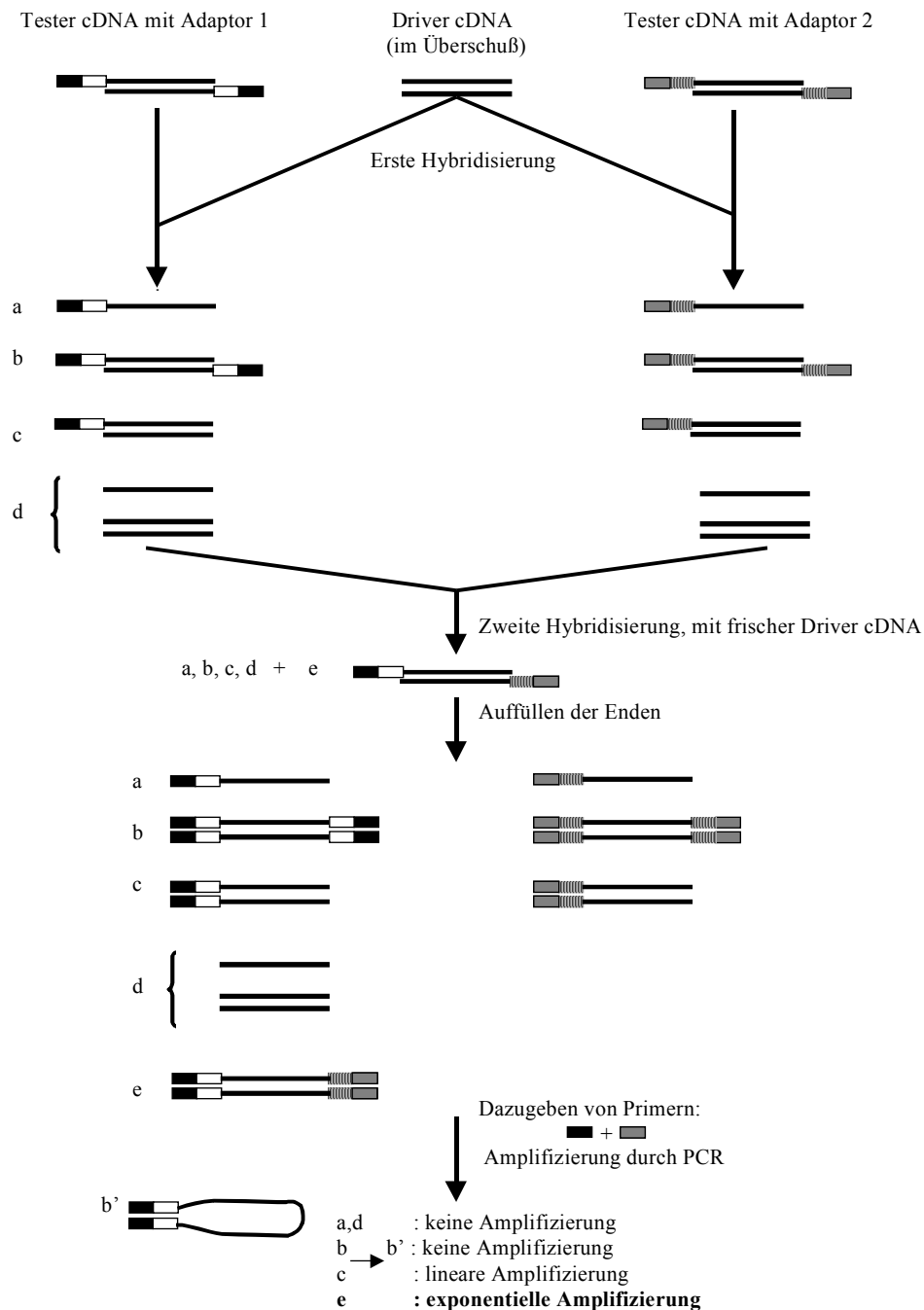


Abb. 1: Schematische Darstellung der PCR-Select cDNA Subtraktion (nach Diatschenko et al. 1996). Die schwarzen Linien repräsentieren die Rsa I verdauten Tester oder Driver cDNAs. Die schwarzen, bzw. grauen Kästen stellen die äußeren Bestandteile der Adaptoren dar. Sie korrespondieren zu den PCR-Primern. Leere und schraffierte Kästen repräsentieren den inneren Anteil der Adaptoren und beinhalten die Sequenzen für die Nested Primer. a: einzelsträngige Tester cDNA mit Adaptor 1 oder 2, b: Hybridisierte Tester-Moleküle, c: Hybride Tester-Driver, d: einzel- oder doppelsträngige Driver, e: Hybride mit Adaptor 1 und 2, b': Schleifenbildung von Tester-Molekülen mit zwei gleichen Adaptoren.

2.2.4.1 Erststrang cDNA Synthese

Als Ausgangsmaterial diente poly-A⁺-mRNA von mit TPA (Tester) bzw. Chelerythrin (Driver) behandelten LN-405 Zellen (siehe Behandlung der Zellen unter 2.2.2.1).

Die RNA wurde auf 0,5 µg/µl eingestellt und jeweils für Tester, Driver und die Kontrolle (poly-A⁺-mRNA vom menschlichen Muskel) in ein 0,5 ml Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 1 µl cDNA Synthese-Primer, Mixen und Zentrifugieren inkubierte der Ansatz bei 70 °C für 2 min, um die RNA-Stränge zu denaturieren. Danach wurden die Proben 2 min auf Eis gekühlt, kurz zentrifugiert und mit 2 µl 5mal First-Strand Puffer, 1 µl dNTP Mix (10 mM), 1 µl H₂O, 1 µl AMV Reverse Transkriptase (20 units/µl) aufgefüllt, gemischt, kurz herunterzentrifugiert, mit 10 µl Mineralöl beschichtet und bei 42 °C 1,5 h inkubiert.

Nach dem Stoppen der cDNA Synthese durch sofortiges Überführen der Probe auf Eis konnte mit der Zweitstrang-cDNA Synthese fortgefahren werden.

2.2.4.2 Zweitstrang-cDNA Synthese

Jede der Proben (Tester, Driver, Kontrolle) wurde mit 48,4 µl H₂O, 16 µl 5mal Second-Strand Puffer, 1,6 µl dNTP Mix (10 mM) und 4 µl 20mal Second-Strand Enzym-Cocktail aufgefüllt, gemischt, kurz zentrifugiert und bei 16 °C für zwei Stunden inkubiert. Daraufhin kamen 2 µl (6 Units) T4 Polymerase dazu. Nach Mischung erfolgte eine weitere Inkubation von 30 min bei 16 °C.

Gestoppt wurde die Synthese durch Zugabe von 4 µl 20mal EDTA/Glykogen. Dann erfolgten zweimal folgende Schritte: Hinzufügen von 100 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1), Vortex, Zentrifugation bei 14.000 rpm für 20 min bei RT, Aufnahme der obersten Phase in ein neues 0,5 ml Röhrchen.

Nach dem letzten Schritt wurde das Pellet mit 500 µl 80%igem Ethanol überschichtet und für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Um das restliche Ethanol zu entfernen, wurde das Pellet, nachdem das Ethanol abgegossen war, 10 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl H₂O aufgenommen. Davon wurden 6 µl in ein frisches Röhrchen überführt und für einen späteren Schritt bei -20 °C eingefroren.

2.2.4.3 Rsa I Verdau

Für den Verdau wurden folgende Komponenten zusammengeführt: 43,5 µl ds cDNA, 10mal Rsa I Restriktionspuffer und Rsa I (10 Units/µl). Nach Vortexen und Zentrifugieren inkubierte der Ansatz bei 37 °C für 1,5 h. Vor dem Stoppen der Reaktion mit 2,5 µl 20mal EDTA/Glykogen konnten 5 µl für die Kontrolle des Verdaus herausgenommen werden. Der Ansatz wurde mit 50 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und nach kräftigem Vortexen für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues 0,5 ml Eppendorfgefäß überführt und

mit 50 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24 : 1) kräftig gevortext, anschließend 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Dann wurde die obere Phase wieder in ein neues Gefäß pipettiert. Dazu kamen 25 µl 4 M NH₄OAc und 187,5 µl 95%iges Ethanol. Der Ansatz zentrifugierte bei Raumtemperatur und 14.000 rpm 20 min. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, das Pellet mit 200 µl 80%igem Ethanol überschichtet und alles wieder bei 14.000 rpm 5 min zentrifugiert. Anschließend konnte der Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet für etwa 5-10 min an der Luft getrocknet werden. Das Pellet wurde dann in 5,5 µl H₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

Dieser Schritt beendete die Präparation von Driver-cDNA und Kontrolle. Für die Tester-DNA erfolgte nun die Adaptorligation.

2.2.4.4 Adaptorligation

Zunächst erfolgte die Aufnahme von jeweils 1 µl der Rsa I verdauten Tester und Kontrolltester in 5 µl H₂O.

Kontrolltesterligation: 1 µl der Kontrolltester-cDNA wurde mit 5 µl der vorbereiteten Kontroll-DNA (Hae 3-digest of ϕ X174 DNA (3 ng/µl), eingestellt auf eine Konzentration von 150 ng/ml) gemischt.

Adaptorligation der Tester DNA: Zunächst wurde ein Mastermix für die Ligation hergestellt. Pro Tester-DNA wurden 3 µl H₂O, 2 µl 5mal Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA Ligase (400 units/µl) zusammengemischt.

Anschließend wurden die Testerligationen nach folgendem Schema pipettiert:

Komponenten	Tester 1-1(Tester/Kontrolle)	Tester1-2 (Tester/Kontrolle)
Tester cDNA	2 µl	2 µl
Adaptor 1 (10 µM)	2 µl	-----
Adaptor 2 (10 µM)	-----	2 µl
Mastermix	6 µl	6 µl
Endvolumen	10 µl	10 µl

Für die Ligationskontrolle wurde von Tester 1-1 und Tester 1-2 jeweils 2 µl in ein extra 0,5 ml Tube überführt.

Bevor die Ligation bei 16 °C über Nacht startete, wurden alle Proben kurz zentrifugiert.

Die Ligation wurde durch Hinzufügen von 1 µl EDTA/Glykogen gestoppt. Anschließend wurden die Proben zur Inaktivierung der Ligase 5 min auf 72 °C erhitzt.

Die Adaptorligation der Tester cDNA war mit diesem Schritt beendet. Vor der ersten Hybridisierung erfolgte eine Kontrolle der Ligation. Von der adaptorligierten Tester-cDNA wurde 1 µl für die PCR in 1 ml H₂O überführt, der Rest bei -20 °C eingefroren.

2.2.4.5 Erste Hybridisierung

Für die erste Hybridisierung wurden die Proben nach folgendem Schema zusammenpipettiert:

Komponente	Probe 1	Probe 2
Rsa I-verdaute Driver cDNA	1,5 µl	1,5 µl
Adaptor 1-ligierter Tester 1-1	1,5 µl	-----
Adaptor 2-ligierter Tester 1-2	-----	1,5 µl
4x Hybridisierungspuffer	1,0 µl	1,0 µl
Endvolumen	4,0 µl	4,0 µl

Der Hybridisierungspuffer wurde vor der Benutzung 20 min bei Raumtemperatur aufgewärmt, um Ausfällungen zu beseitigen. Anschließend kam auf die Proben ein Tropfen Mineralöl, die Proben wurden kurz zentrifugiert und im Thermocycler für 1,5 h bei 98 °C, dann 8 h bei 68 °C inkubiert. Daraufhin folgte sofort die zweite Hybridisierung.

2.2.4.6 Zweite Hybridisierung

In der zweiten Hybridisierung wurden die Proben aus der ersten Hybridisierung mit frisch denaturierten Drivern inkubiert. Für die Denaturierung der Driver wurden 1 µl Driver cDNA, 1 µl 4mal Hybridisierungspuffer und 2 µl H₂O gemischt. Davon wurden 1 µl mit Mineralöl überschichtet und im 0,5 µl Tube für 1,5 min bei 98 °C denaturiert. Dann wurden die frisch denaturierten Driver mit den Proben aus der ersten Hybridisierung (Probe 1 und 2) zusammenpipettiert, gemischt und über Nacht bei 68 °C inkubiert. Die Hybridisierung konnte durch das Hinzufügen von 200 µl Dilutionspuffer und Inkubation für weitere 7 min bei 68 °C gestoppt werden. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.4.7 PCR-Amplifikation

Vor der PCR wurde 1 µl der hybridisierten Proben und 1 µl der mit Adaptoren ligierten, unsubtrahierten Tester-Kontrollen (s.a. Adaptorligation unter 2.2.4.4) gemischt. Es wurde ein Mastermix entsprechend den Mengen für die einzelnen Proben laut untenstehender Tabelle angefertigt.

Komponente	Menge pro Probe in µl
H ₂ O	19,5
10x PCR Reaktionspuffer	2,5
dNTP Mix (10 µM)	0,5
PCR Primer 1 (10 µM)	1,0
50x Advantage cDNA Polymerase Mix	0,5
Endvolumen	24,0

Alles wurde gut gemischt, kurz zentrifugiert und zu den zuvor vorbereiteten Proben gegeben. Nach Überschichten mit 50 µl Mineralöl inkubierten die Proben 5 min bei 75 °C. Sofort darauf erfolgte die PCR mit folgenden Schritten: 27mal: 94 °C 30 sec, 66 °C 30 sec, 72 °C 1,5 min.

Zur Überprüfung der PCR wurden 8 µl entnommen. Zur Vorbereitung der zweiten PCR dienten 3 µl, die in 27 µl H₂O verdünnt wurden.

Auch für die zweite PCR wurde wieder ein Mastermix angefertigt:

Komponente	Menge pro Reaktion in µl
H ₂ O	18,5
10x PCR Reaktionspuffer	2,5
Nested PCR Primer 1 (10 µM)	1,0
Nested PCR Primer 2 (10 µM)	1,0
dNTP Mix (10 µM)	0,5
50x Advantage cDNA Polymerase Mix	0,5
Endvolumen	24,0

Die Komponenten wurden gut gemischt und mit 1 µl der vorher verdünnten ersten PCR-Reaktion zusammengeführt, mit Mineralöl überschichtet und nach folgendem Zyklus behandelt: 27mal: 94 °C 30 sec, 68 °C 30 sec, 72 °C 1,5 min. Davon konnten 8 µl zur Überprüfung entnommen werden, der Rest wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.4.8 Qualität der mRNA

Die mRNA wurde zunächst auf einem denaturierendem Agarosegel aufgetragen (siehe RNA-Gel unter 2.2.7.1). Dann erfolgte eine weitere Kontrolle durch Amplifikation von Aldolase, einem Housekeeping-Gen. Zunächst mußte dazu die mRNA durch reverse Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben werden. Für die RT und die Amplifikation wurde der „1st Strand cDNA Synthesis Kit“ von Boehringer benutzt.

2.2.4.9 Reverse Transkription zur Umschreibung der RNA in cDNA

Von der mRNA wurde 0,1 µg mit 2 µl 10mal Reaktionspuffer, 25 mM MgCl₂, 2,0 µl dNTP-Mix, 1 µl RNase Inhibitor, 2 µl Hexaprimer und 0,8 µl AMV-Reverse Transkriptase gemischt. Während der ersten Inkubation von 25 °C für 10 min legen sich die Primer an die RNA. Während der zweiten Inkubation von 42 °C für eine Stunde läuft die eigentliche reverse Transkription ab, die RNA wird in cDNA umgeschrieben. Zur Denaturierung der AMV-Reverse Transkriptase wurde die Probe für 5 min auf 99 °C erhitzt. Vor der weiteren Verarbeitung wurde die Probe auf 4 °C gekühlt.

2.2.4.10 Amplifikation von Aldolase

Nach der reversen Transkription erfolgte die PCR für Aldolase. Vom RT-Produkt wurde 1 µl mit 2 µl 10mal Reaktionspuffer, inkl. MgCl₂, 0,2 mM dNTP-Mix, 0,2 µM Upstream- und 0,2 µM Downstream-Aldolase Primer und 2,5 Units/100 µl Taq DNA Polymerase vermischt. Dann wurde der Ansatz für 3 min bei 94 °C denaturiert. Anschließend erfolgten 40 Zyklen mit 1,5 min Denaturierung bei 94 °C, 2 min Annealing bei 56 °C und 3 min Extension bei 72 °C. Zum Schluß folgte ein Extensionsschritt bei 72 °C für 5 min, dann wurden die Proben auf 4 °C heruntergekühlt.

Die Proben konnten nun auf einem DNA-Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid eingefärbt und unter UV-Licht beurteilt werden.

2.2.4.11 Analyse des Rsa I Verdau

Zur Analyse des Rsa I Verdaus wurden 5 µl des Verdaus gegen 2,5 µl unverdauter dsDNA auf einem 1%igem Agarosegel in einmal TAE Puffer aufgetragen.

2.2.4.12 Analyse der Ligation

Zur Analyse der Ligation wurde 1 µl jeder Ligation in 200 µl H₂O aufgenommen und nach folgendem Schema zusammenpipettiert:

Komponente	1 (µl)	2 (µl)	3 (µl)	4 (µl)	5 (µl)
Tester 1-1 (ligiert mit Adaptor 1)	1	--	--	--	--
Tester 1-2 (ligiert mit Adaptor 2)	--	1	--	--	--
Ligationskontrolle (Adaptor 1+2)	--	--	1	1	1
G3PDH 3'Primer (10 µM)	1	1	1	1	1
G3PDH 5'Primer (10 µM)	--	--	--	--	1
PCR Primer 1(10 µM)	1	--	1	--	--
PCR Primer 2 (10 µM)	--	1	--	1	--
Endvolumen	3	3	3	3	3

Danach wurden jedem Ansatz folgende Komponenten hinzugefügt: 18,5 µl H₂O, 2,5 µl 10mal PCR Reaktionspuffer, 0,5 µl dNTP Mix (10 mM) und 50mal Advantage cDNA Polymerase Mix.

Nach Vortexen und Zentrifugieren inkubierten die Proben 5 min bei 75 °C und wurden anschließend folgendem PCR Zyklus unterworfen: 20mal: 94 °C 30 sec, 65 °C 30 sec, 68 °C 2,5 min. Daraufhin konnten die Proben auf einem 2%igem Agarosegel in einmal TAE Puffer auf erfolgreiche Ligation hin überprüft werden.

2.2.4.13 Analyse der PCR-Produkte

Die Analyse der PCR Produkte erfolgte durch Auftrag von 5 µl der Produkte und ϕ X147/Hae III Fragmente auf 2%igen Agarosegelen in einmal TAE Puffer.

2.2.5 Klonierung und Transformation

Die Klonierung der DNA-Amplifikate wurde mit dem pCR[®] 2.1 Vektor und mit dem TA-Cloning Kit von Invitrogen durchgeführt.

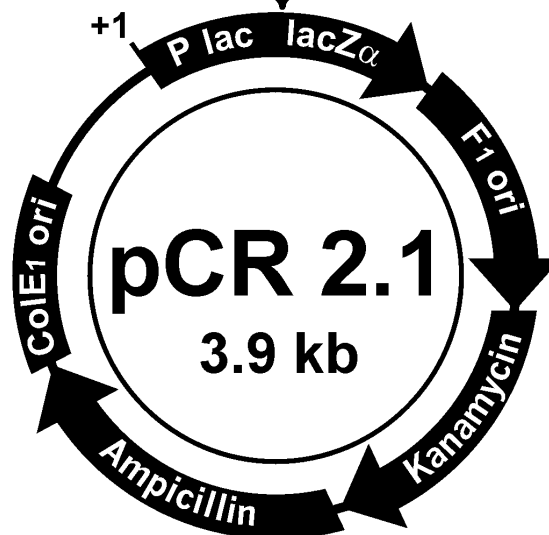
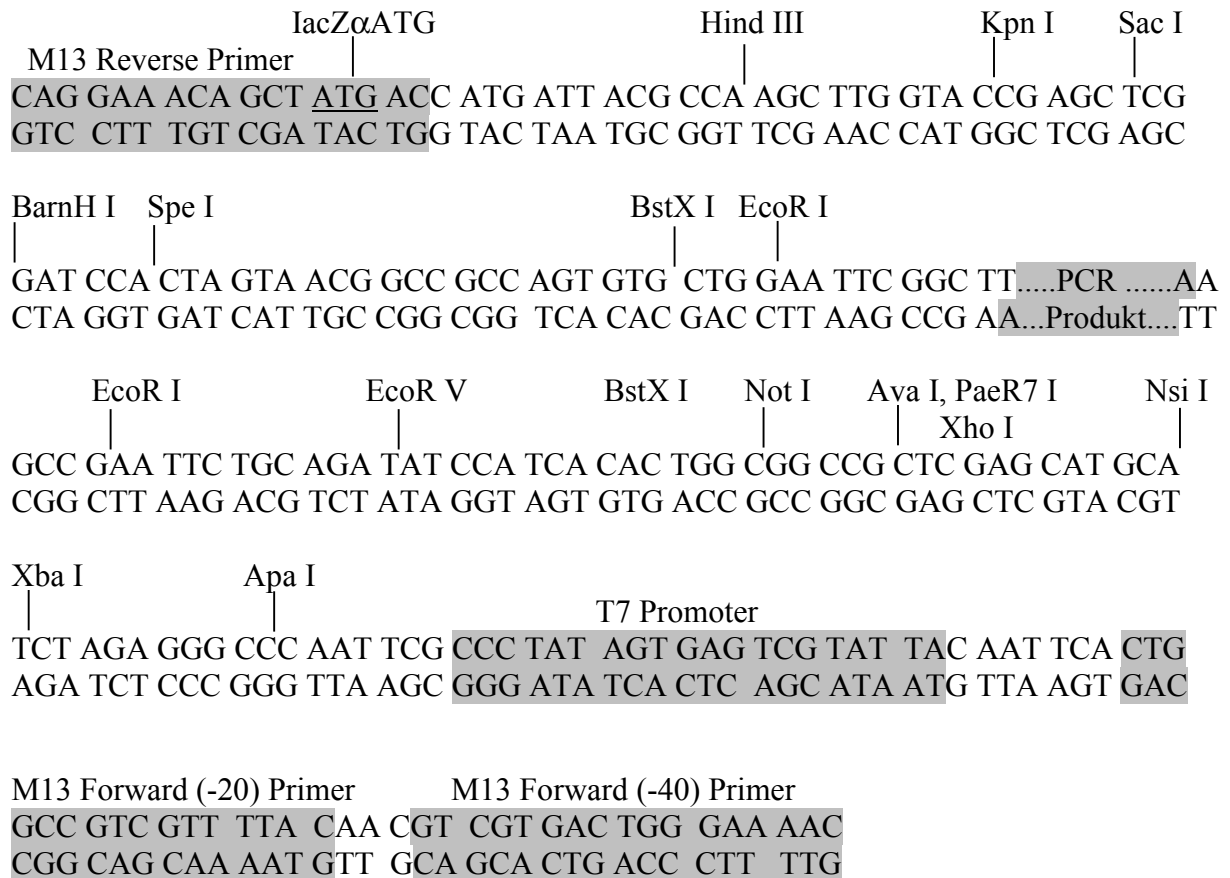


Abb. 2: pCR[®] 2.1 Vektor (nach: Handbuch zu TA Cloning[®] Kit). Die Abbildung zeigt den Klonierungsvektor. Das eingefügte PCR-Produkt wird von zwei EcoR I Schnittstellen eingeschlossen. Zu sehen sind weiterhin die Ansatzstellen für die verschiedenen Primer.

2.2.5.1 Reinigung der Proben und Ligation

Vor der Klonierung wurden die Proben mit dem High PCR Produkt Purification Kit gereinigt.

Zu jeder Probe kam 5 Vol Bindungspuffer (3 M Guanidin-Thiocyanat, 10 mM Tris-HCl, 5% Ethanol, pH 6,6) und nach Mischen wurde der Ansatz in das High-Pure-Reaktionsgefäß pipettiert. Die Proben zentrifugierten 30 sec, danach konnte der Durchfluß verworfen und 5 Vol Waschpuffer (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5) dazugegeben werden. Nach 30 sec Zentrifugieren wurde der Durchfluß wiederum verworfen und erneut mit 2 Vol Waschpuffer gewaschen. Im Anschluß an die zweite Waschung wurde die DNA mit 200 µl Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,5) eluiert und mit 100 µl 4 M NH₄OAc und 750 µl Ethanol, 95%, bei -70 °C gefällt.

Die DNA wurde in H₂O aufgenommen.

Für die Klonierung wurden zwei Ansätze verwendet. Im ersten Ansatz wurden 12,8 ng DNA bei einem Plasmid/Vektorverhältnis von 1:1 gewählt, im zweiten 40 ng bei einem Plasmid/Vektorverhältnis von 1:3.

Der Ansatz wurde folgendermaßen zusammengestellt:

Komponente	µl
PCR- Produkt	4 (12,8 / 40 ng)
10x Ligationspuffer	1
PCR 2,1 Vektor (25 ng/µl)	2
H ₂ O	2
T4 DNA Ligase (4.0 Weiss units)	1
Endvolumen	10

Die Ansätze ligierten bei 14 °C über Nacht, am nächsten Tag erfolgte die Transformation.

2.2.5.2 Transformation

Zur Transformation wurden für jede Ligation 50 µl Bakteriensuspension (Invitrogen-Kit) aufgetaut und mit 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol gemischt. Zu den so vorbereiteten Bakteriensuspensionen kamen 2 µl der Ligation. Danach kühlten die Ansätze 30 min auf Eis und wurden anschließend 30 sec bei 42 °C im Wasserbad erhitzt. Nach 2 min auf Eis wurde 250 µl SOC Medium (2% Bactotrypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 1 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ und 20 mM Glukose) dazugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Von der so erhaltenen Bakterien-Suspension wurden 50-200 µl auf LB-Agarplatten mit Ampicillin überführt. Anschließend wurden die Platten für 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dann kamen die Platten für vier Stunden in den Kühlschrank (4 °C).

Die weißen, Inserts enthaltenden Kolonien wurden gepickt und auf 5 ml LB-Medium + 500 µl Ampicillin überimpft. Die Ansätze wurde über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

2.2.5.3 Minipräparation

50 µl der Bakteriensuspension wurden in 50 ml LB-Medium + 500 µg Ampicillin aufgenommen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Übernachtskultur abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl Lsg. A (1 ml 0,5 M Glukose, 1 ml 0,1 M EDTA, 0,5 ml 1 M TrisCl, 7,5 ml H₂O) aufgenommen und bei RT 5 min stehengelassen. Dann kamen 200 µl Lsg. B (1 ml NaOH 1 N, 0,5 ml 10 % SDS, 3,5 ml H₂O) dazu und alles wurde auf Eis 5 min gekühlt. Nach der Zugabe von Lsg. C (10 ml: 2,43 g NaOAc, 1,15 ml Hac, zu 10 ml mit H₂O auffüllen) wurde der Ansatz wiederum auf Eis 5 min gekühlt. Der Überstand wurde 10 min zentrifugiert, mit 25 µl RNase versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von ein Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wurde alles 5 min bei RT stehengelassen. Der Überstand konnte nach 10 min Zentrifugieren in zwei Vol Ethanol überführt und bei -70 °C gefällt werden. Nach 10 min Zentrifugieren und Abgießen des Überstandes wurde das Pellet in 50 µl H₂O aufgenommen.

2.2.5.4 Kontrolle der Klonierung

Um festzustellen zu können, ob die Klonierung zu Inserts in den Plasmiden geführt hat und um einen Überblick über deren Größe zu erhalten, wurden 10 µl der Plasmid-Suspension mit 1 µl EcoRI, 2 µl 10mal Puffer (H) und 7 µl H₂O vermischt und bei 37 °C verdaut. Der Verdau wurde dann auf einem 2%igen Agarosegel aufgetragen.

2.2.6 Sequenzierung

2.2.6.1 Herstellen der Proben

Die Sequenzierung der DNA wurde mit dem „Thermo-Sequenase-fluorescent-labeled-primer-cycle-sequencing-kit with 7-deaza-dGTP“ von Amersham durchgeführt.

Die Plasmid-DNA wurde auf eine Konzentration von 250 ng/2 µl eingestellt. Davon wurden jeweils 2 µl mit 1 µl Primer (M13 universal (-21), 18 mer: 5`TGT AAA ACG ACG GCC GCC AGT 3`) und 1 µl eines dNTP-MIX (A, T, G, oder C) gemischt, mit 10 µl Wachs abgedeckt und nach folgendem Programm behandelt: 95 °C 2 min, 30mal: 95 °C 15 sec, 57 °C 15 sec, 70 °C 15 sec, anschließend Kühlung auf 4 °C. Daraufhin wurde die Reaktion mit 3 µl Stopplösung bei 70 °C für 3 min gestoppt.

Die Proben konnten nun auf das vorbereitete Gel aufgetragen und im LI-COR DNA-Sequencer 4200 sequenziert werden.

2.2.6.2 Durchführung der Sequenzierung

Für das Gel wurden 45 ml Sequagel 6%, 11,25 ml Sequagel Puffer, 600 µl DMSO und 450 µl 10% frisches APS 3 min verrührt und zwischen die vorher sorgfältigst gereinigten Glasplatten gegossen (Dicke der Gelschicht: 0,25 mm) und für mindestens eine Stunde polymerisiert.

Vor dem Auftragen der Proben mußte das Gel ca. 30 min in einmal TBE Puffer (10mal TBE: 162,0 g Tris Base, 27,5 g Borsäure, 9,5 g EDTA zu 1 l H₂O) vorlaufen.

Die Proben liefen dann über Nacht im Sequenzierer und wurden am nächsten Tag ausgewertet.

Der Sequenzvergleich erfolgte über das BLAST-Search Programm der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI).

2.2.7 Radioaktive Northernblot-Analyse

2.2.7.1 RNA-Gel

Dazu wurden je Probe 10 µg Gesamt-RNA auf ein denaturierendes Agarosegel gegeben.

Die Agarose (0,9 %) wurde in einmal MOPS-Puffer (25mal MOPS: 1 M MOPS, pH 7, 250 mM NaAc, 25 mM EDTA) aufgekocht, das Formaldehyd (Endkonzentration: 9%) dazugegeben und das Gel unter dem Abzug in der Gelkammer polymerisiert. Jede Probe wurde mit zwei Teilen Probenpuffer (500 µl Formamid, 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml), 1 µl 0,5 M EDTA pH 8, 10 mg Bromphenolblau) gemischt und bei 65 °C für 10 min inkubiert. Anschließend kamen die Proben 5 min auf Eis. Nach dem Erstarren des Gels wurden die Proben aufgetragen und bei 60-80 Volt in 2-3 Stunden aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht.

2.2.7.2 Blotten

Nach der UV-Kontrolle wurden die Proben über Nacht auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Das Blotten erfolgte nach den Vorgaben von Maniatis et al. (1982). Hierzu wurde das Gel, um das Formaldehyd zu entfernen, ca. 10 min in H₂O bidest. gelegt. Anschließend wurde das Gel auf ein mit 20mal SSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0) getränktes Whatmann-Papier gelegt, wobei dessen Enden in ein Pufferreservoir mit 20mal SSC hineinragten. Auf das Gel wurde die Membran und darüber, unter einem 10 cm hohen Stapel Papierhandtücher, 5 Lagen Whatmannpapier gelegt. Der gesamte Aufbau wurde dann mit einem Gewicht von 1 kg beschwert. Der Kapillarblot erfolgte über Nacht bei RT. Am nächsten Tag konnte die RNA durch Backen für zwei Stunden bei 80 °C fixiert und für die Lagerung bis zur weiteren Bearbeitung in PVC-Folie eingeschweißt werden.

2.2.7.3 Sondenherstellung

Die Plasmide mit den Sequenzeinschlüssen wurden auf eine Konzentration von 0,2 ng eingestellt und die Sonden für die radioaktive Markierung wurden mittels PCR hergestellt. Dazu wurde der folgende PCR Ansatz vorbereitet:

Menge in μl	Komponente
40	H ₂ O
5	10x KlenTaq Puffer
1	Template (0,2 ng)
1	Nested Primer 1
1	Nested Primer 2
1	50x dNTP-Mix (50 mM)
1	KlenTaq Polymerase Mix
50	Endvolumen

Programm für die PCR: 94 °C 1 min, 30mal: 94 °C 30 sec, 68 °C 3 min, anschließend 68 °C 3 min und 15 °C bis zur Weiterverarbeitung.

2.2.7.4 Aufreinigung der Sonden

Um Verunreinigungen, z.B. Nukleotide, zu entfernen, wurden die Sonden mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt.

Die Proben wurden mit 5 Volumen Bindungspuffer (PB) aufgefüllt und kräftig gemischt. Daraufhin kamen die Proben in eine QIAquick-Säule und zentrifugierten 30 sec. Der Durchfluß wurde verworfen und die Probe mit 0,75 ml Wasch-Puffer (PE) überschichtet und zentrifugiert. Nachdem der Durchfluß verworfen worden war, wurden die Proben erneut für eine min zentrifugiert. Dann erfolgte die Eluierung durch Zugabe von 30 μl H₂O und anschließender einminütiger Zentrifugation. Nach Abschluß der Aufreinigung wurden die Proben abermals auf einem 20%igem Agarosegel überprüft. Dabei erfolgte die Konzentrationsbestimmung anhand des Markervergleichs.

2.2.7.5 Markierung der Sonden und Hybridisierung

Die Markierung der Sonden mit [α -³²P]dCTP (Amersham) erfolgte mit dem Megaprime DNA-labelling-Kit von Amersham. Etwa 25 ng der Proben wurden in 45 μl H₂O aufgenommen und mit 5 μl Primern gemischt. Danach erfolgte 5 min die Denaturierung bei 99 °C. Die Proben wurden herunterzentrifugiert und bei Raumtemperatur mit 10 μl Markierungspuffer, 5 μl α -³²P dCTP und 2 μl Klenow-Fragment der DNA-Polymerase vorsichtig gemischt, zentrifugiert und bei 37 °C 10 min inkubiert. Gestoppt werden konnte die Reaktion durch Zugabe von 5 μl 0,2 M EDTA und Denaturieren für 5 min bei 99 °C. Bevor die Proben, nach Zugabe von 100 μl Lachssperma-DNA, ein weiteres mal zwei min bei 99 °C denaturiert wurden, kühlten sie auf Eis ab.

Die Blots wurden in der Zwischenzeit aus der Folie genommen, in H₂O bidest. gewaschen und bei 58 °C für mindestens 20 min im QuikHyb-Hybridisierungspuffer prähybridisiert.

Die markierten Sonden konnten dann zu den Blots in den Hybridisierungsröhrchen gegeben werden und über Nacht bei 58 °C im Rotationsofen hybridisieren.

Am nächsten Tag wurden die Blots je nach Strahlungsintensität (gewünscht waren etwa 30-40 ips) nach folgendem Schema gewaschen: zweimal 15 min mit zweimal SSC/0,1% SDS bei RT und einmal 30 min mit 0,1mal SSC/0,1% SDS. Danach wurden die Blots sofort in Folie eingeschweißt, im Phosphorimager beurteilt und in einer Filmkassette mit einem Film (Hyperfilm-MP, Amersham, Braunschweig) bei -80 °C eingeschlossen. Je nach Stärke des Signals wurden die Filme einige Stunden bis mehrere Tage belichtet.

2.2.7.6 Waschen und Regenerieren der Membranen

Um die Blots für mehrere verschiedene Sonden bzw. die Kontrollsonde G3PDH verwenden zu können, wurden die Membranen nach erfolgter Hybridisierung und Filmbelichtung gewaschen: zweimal 15 min in 0,1mal SSC/0,1mal SDS bei 100 °C.

2.2.8 Auswertung

Zur Auswertung der Signalstärken wurden die Filme der Northernblots oder die Phosphordensitometerbilder verwendet. Mithilfe des Programms Molecular Analyst von BioRad (München), wurde für jedes Signal auf einem Blot die Signalstärke innerhalb eines gleich großen Feldes bestimmt.

Um Fehler durch Auftragen unterschiedlicher RNA-Mengen auszugleichen, wurden die Werte der spezifischen Gensonden, nach Abzug der Leerwerte, durch die Werte für die G3PDH-Sonden des entsprechenden Blots geteilt. Die so gefundenen Werte wurden dann durch den Ausgangswert, d.h. den unbehandelten Wert geteilt, um die Veränderungen besser abschätzen zu können.

3 Ergebnisse

3.1 Kontrolluntersuchungen

3.1.1 Kontrolle der mRNA für die PCR-Select

Um die Integrität der poly-A⁺-mRNA zu überprüfen, wurden die Proben zunächst zusammen mit der Gesamt-RNA und dem 2. Eluat der mRNA-Isolation auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetragen (Abb. 3). Darin erkennt man die Integrität der Gesamt-RNA an den typischen Banden in Höhe von ~4,5 und 1,9 kb, die der 28S- und 18S-Fraktion der rRNA entsprechen. Die Bahnen für die mRNA zeigen entsprechend der Größe der verschiedenen mRNAs einen Schmier in Höhe von 0,5-12 kb mit schwachen rRNA-Banden.

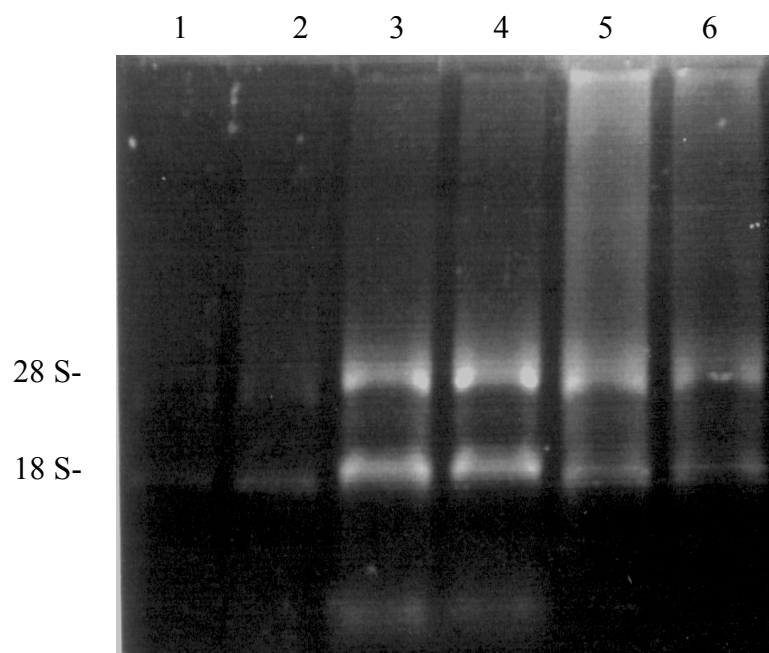


Abb. 3: RNA-Kontrolle. 1%iges denaturierendes Agarosegel. 1 + 2: gesamt-RNA, TPA/Chel behandelt, 3 + 4: 2. Eluat der mRNA-Isolation, 5 + 6: mRNA.

Dann wurde die Qualität der mRNA durch Amplifikation eines Housekeeping-Gens untersucht. Aldolase ist ein Enzym der Glykolyse und in allen Zellen ungefähr gleich stark exprimiert. Die Amplifikation zeigt an, daß die mRNA intakt ist (Abb. 4).

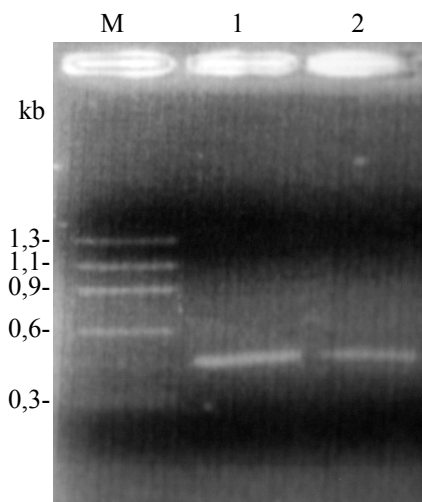


Abb. 4: Kontrolle der RNA durch Aldolase RT-PCR. 2%iges Agarosegel. M: ϕ X147/Hae III DNA-Längenmarker. 1 + 2: PCR-Fragment nach RT-PCR mit Aldolase-Primern, RNA TPA/Chel behandelt.

3.1.2 Kontrolle des Rsa I Verdau

Bevor die Subtraktion und Adaptor-Ligation erfolgen konnte, wurden die ds Tester- und ds Driver-Moleküle mit Rsa I verdaut. Bei diesem Schritt entstehen kurze, „blunt-ended“ ds cDNA-Fragmente. In der Kontrolle zeigt die unverdaute ds cDNA einen Schmier von 0,5-10 kb. Nach dem Rsa I-Verdau ist die durchschnittliche cDNA-Größe geringer und liegt bei 0,1-2 kb (Abb. 5).

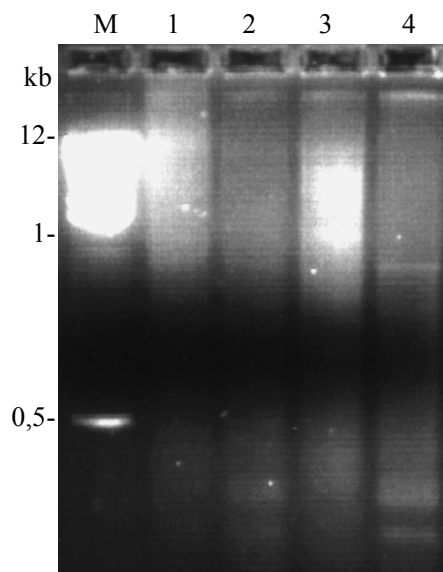


Abb. 5: Kontrolle Rsa I Verdau. 1%iges Agarosegel, M: DNA-Längenmarker X, 1 + 3: unverdaute ds cDNA, 2 + 4: Rsa I verdaute cDNA.

3.1.3 Kontrolle der Adaptorligation

Die Kontrolle der Adaptorligation zeigt, daß wenigstens 25% der cDNAs Adaptoren an beiden Enden haben. Dazu wird der G3PDH-Primer benutzt. Bei effizienter Ligation ist die Intensität der Bande bei Benutzung eines genspezifischen Primers (G3PDH 3') und PCR-Primer (PCR-Primer 1 oder 2) genauso stark wie bei Benutzung von zwei genspezifischen Primern (G3PDH 3' und 5'). Dabei darf die Intensität bis zum Faktor 4 abweichen, um noch als effizient zu gelten (Abb. 6).

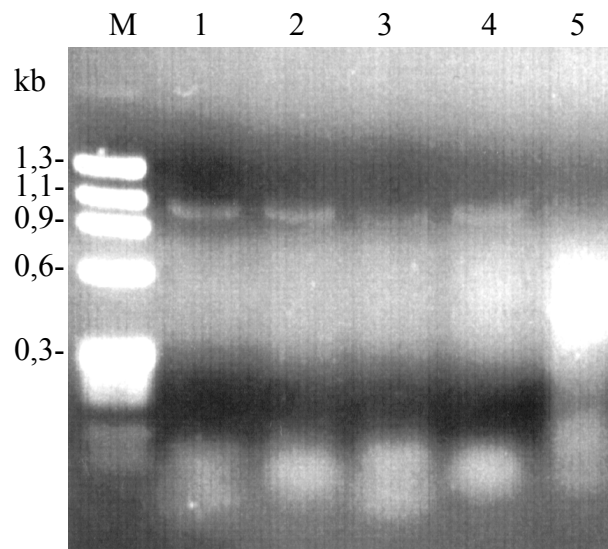


Abb. 6: Ligationskontrolle. 2%iges Agarosegel. M: ϕ X147/Hae III DNA-Längenmarker. PCR-Fragmente unter Verwendung von 1: Tester 1-1 (Adaptor 1) als Template und G3PDH3'-+ PCR-Primer 1, 2: Tester 1-2 (Adaptor 2) und G3PDH3'-+ PCR-Primer 2, 3: Ligationskontrolle 1c (Adaptor 1 + 2) und G3PDH3'- und PCR-Primer 1, 4: Ligationskontrolle 1c (Adaptor 1 + 2) und G3PDH3'- und PCR-Primer 2, 5: Ligationskontrolle 1c (Adaptor 1 + 2) und G3PDH3'- + G3PDH5'-Primer. (Die Abbildung ist in dieser Darstellung überbelichtet, so daß man die einzelne Bande der Bahn 5 (Größe etwa 0,5 kb), anders als im Originalbild, nicht erkennt.)

3.1.4 Kontrolle der PCR-Amplifikation

Zum Abschluß des PCR-Select-Verfahrens erfolgte die Amplifizierung der potentiell differentiell exprimierten Gene. Die Kontrolle der Amplifikate wurde durch Auftrag auf ein 2%iges Agarosegel nach der zweiten PCR durchgeführt. Dabei zeigt die Kontroll-cDNA ein dem ϕ X175/Hae III Marker ähnliches Bild. Die unsubtrahierte cDNA bietet ein von der subtrahierten cDNA komplett unterschiedliches Bild. Die subtrahierte Probe ergibt einen Schmier mit einzelnen, voneinander getrennten Banden (Abb. 7).

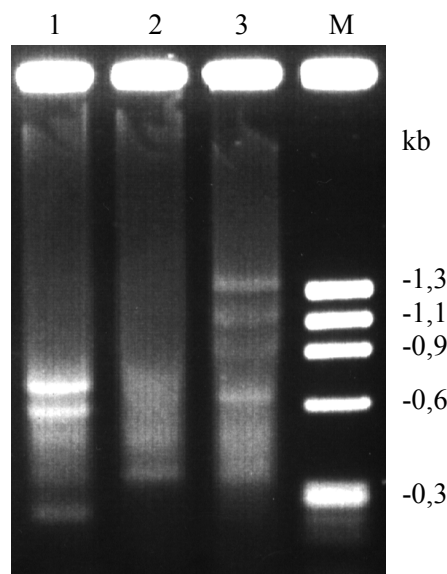


Abb. 7: Kontrolle der PCR-Amplifikation. 2%iges Agarosegel. M: ϕ X147/Hae III DNA-Längenmarker. 1: unsubtrahierte Tester-cDNA, 2: subtrahierte Tester-cDNA, 3: Kontroll-cDNA.

3.1.5 Kontrolle der Eco RI verdauten Plasmid-Inserts

Die Amplifikate wurden zunächst in einen Klonierungsvektor ligiert und kompetente *E. coli* damit transfiziert. Nach der Transformation wurden insgesamt 48 Klone gepickt und für die weiteren Untersuchungen verwendet. Um einen Überblick über die Größe der Inserts zu erhalten, wurden die Plasmide jeweils mit Eco RI verdaut und auf einem 2%igem Agarosegel aufgetragen (Abb. 8 bis Abb. 11). Die Inserts haben hiernach Größen von 0,2-1,3 kb.

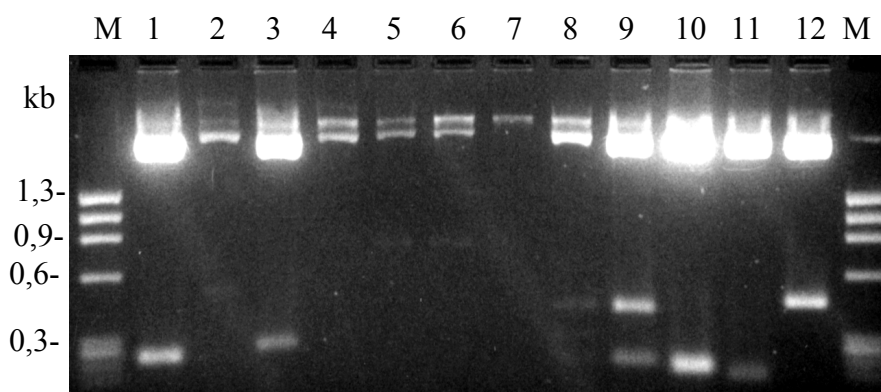


Abb. 8: EcoRI verdaute Plasmid-Inserts. M: ϕ X147/Hae III DNA-Längenmarker, 1-12: Inserts, aus EcoRI verdauten Plasmiden (1, 5, 6, 8, 9: IL-8; 2, 4: nicht eindeutig identifiziert; 3: Methionin-Adenosyltransferase; 7: keine Sequenzierung möglich; 10: Interferon- γ Rezeptor 2; 11: Metalloprotein-stimulin; 12: Cosmid F0811).

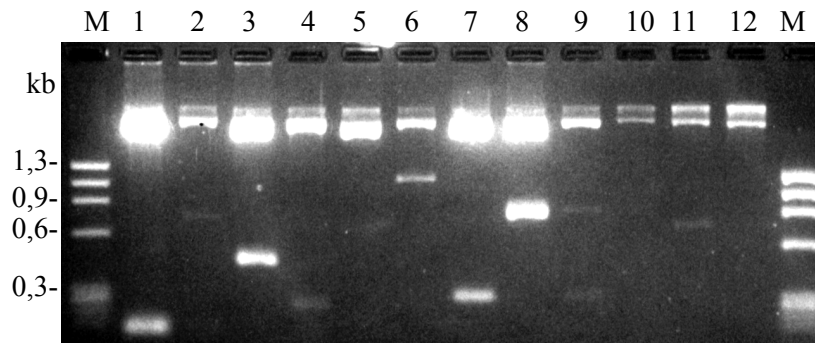


Abb. 9: EcoRI verdaute Plasmid-Inserts. M: ϕ X147/Hae III DNA-Längenmarker, 1-12: Inserts, aus EcoRI verdauten Plasmiden (1, 5: Klonierungsvektoren; 2, 4: Calpain; 3, 7, 10: nicht eindeutig identifiziert; 6, 9: CA-repeat Sequenz, 8: alpha-2 Kollagen; 11: IL-8, 12: keine Sequenzierung möglich).

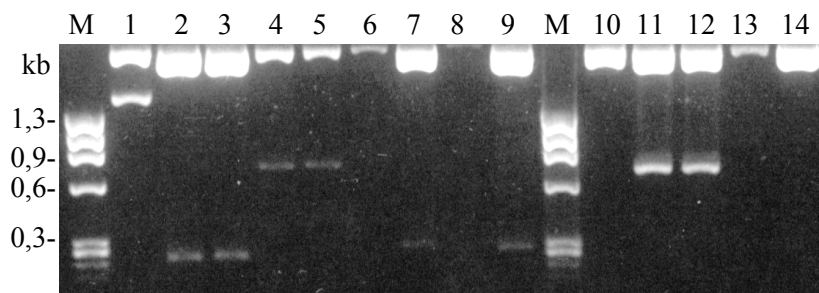


Abb. 10: EcoRI verdaute Plasmid-Inserts. M: ϕ X147/Hae III DNA-Längenmarker, 1-12: Inserts, aus EcoRI verdauten Plasmiden (1: PAC; 2: PVT; 3-5, 11, 12: IL-8; 6: ect2-Oncogen; 7: MPP1; 8: MBP-2; 9: β_2 -adrenerger Rezeptor; 10: nicht eindeutig identifizierbar; 13: keine Sequenzierung möglich; 14: Metallopanstimulin).

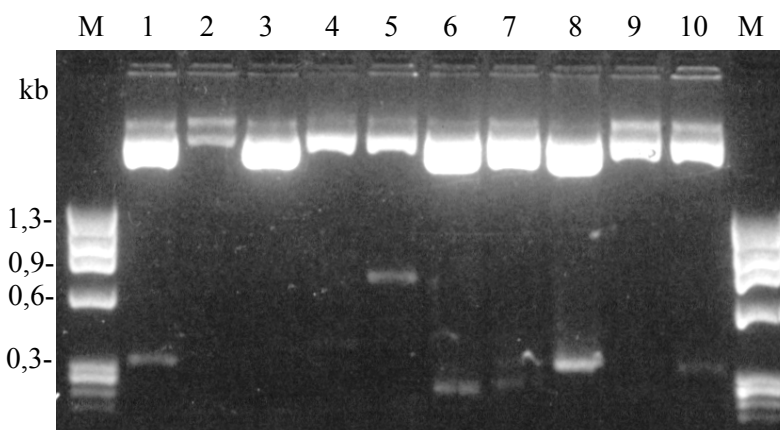


Abb. 11: EcoRI verdaute Plasmid-Inserts. M: ϕ X147/Hae III DNA-Längenmarker, 1-12: Inserts, aus EcoRI verdauten Plasmiden (1, 7: nicht eindeutig identifizierbar; 2, 3: H. ribosomal DNA; 4-6, 9: IL-8; 8: ERM-Gen; 10: ODC-Antizym 2).

3.2 Sequenzierung

3.2.1 Erläuterungen zu den Ergebnissen der Sequenzierungen

Die Sequenzierung im „LI-COR DNA Sequencer 4000“ und Auswertung wurde mit der „Base Image JR™“ Software von Li-Cor durchgeführt. Der Sequenzvergleich erfolgte über das BLASTSearch Programm des „National Center for Biotechnology Information“ (USA).

Nachfolgend sind die gefundenen Sequenzen und die Ergebnisse des Sequenzvergleichs dargestellt. Bei einigen Sequenzen konnten beide Nested-Primer, als Flanken der Inserts, gefunden werden, bei anderen Sequenzen nur einer. Zur Darstellung kommen nur die Inserts, ggf. mit den Nested-Primern. Dabei entsprechen, wie üblich, die Großbuchstaben A und G den Nukleotiden der Purinbasen Adenin und Guanin, die Buchstaben C und T den Nukleotiden der Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin, bzw. Uracil. Kann ein Nukleotid nicht genau zugeordnet werden, kommen die entsprechenden Kleinbuchstaben (a, g, c, t) zum Einsatz, wenn die zugehörige Base als am wahrscheinlichsten angenommen wird. Alle anderen Zweifelsfälle werden laut nachstehender Tabelle beschrieben:

Tabelle 2: Buchstabencode Sequenzauswertung

Buchstabe	Entspricht Base	Buchstabe	Entspricht Base
R	A oder G	B	C oder G oder T (U)
Y	C oder T (U)	D	G oder A oder T (U)
M	C oder A	H	A oder C oder T (U)
K	G oder T (U)	V	A oder C oder G
W	A oder T (U)	N	keine Festlegung
S	C oder G		

In der Darstellung der Sequenzen werden bei denjenigen Sequenzen, bei denen nur eine lückenhafte Zuordnung stattfinden konnte, die übereinstimmenden Abschnitte durch Unterstreichungen gekennzeichnet. Diejenigen Sequenzen, die vollständig oder nahezu vollständig zugeordnet werden konnten, werden ohne Unterstreichungen abgebildet.

3.2.2 Erläuterungen zu den BLASTSearch Ergebnissen

In der obersten Zeile der BLASTSearchResult wird zuerst eine Identifikationsnummer des entsprechenden Gens für die Datenbank angegeben. Dann folgt eine kurze Beschreibung der zugehörigen Sequenz (Name, Art, z.B. mRNA und Länge).

Darunter erfolgen Angaben zum Auswertungsergebnis:

Score: Der Score wird aus den Übereinstimmungen der Anfrage mit Sequenzen aus der Datenbank errechnet und mit statistischen Parametern bearbeitet. Er kann dazu dienen, verschiedene Suchanfragen zu vergleichen.

Identities: Hier wird angegeben, wie viele Übereinstimmungen innerhalb der Suchanfrage, bzw. des zugeordneten Bereiches daraus, mit der gefundenen Sequenz existieren.

Gaps: Der Gap-Wert beschreibt, wie viele Nukleotide in der Suchanfrage in Bezug auf den komplementären Strang fehlen.

Expect-value: (Erwartungswert) Dieses ist der eigentlich wichtige Wert, um die Wahrscheinlichkeit abzuschätzen, mit der die gefundene Sequenz auch tatsächlich die Suchanfrage darstellt. Im Prinzip wird angegeben, wie viele „Treffer“ man bei entsprechenden Bedingungen (Länge der Suchanfrage und Übereinstimmungen) in der Gendatenbank bei gleichem oder besserem Bit-score zufällig landen würde. Je kleiner der Erwartungswert, desto signifikanter ist das Suchergebnis.

Unter der Auswertung erfolgt zusätzlich noch eine graphische Darstellung. Die obere Zeile beinhaltet die Suchanfrage. Übereinstimmungen mit der gefundenen komplementären Sequenz in der unteren Zeile werden durch Verbindungslinien deutlich gemacht. Fehlende Nukleotide werden durch Querstriche gekennzeichnet. Die Stellung der gefundenen Sequenz innerhalb eines Gens ist durch die Numerierung der Nukleotide nachvollziehbar.

Wenn nicht anders angegeben stammen die Informationen zu den einzelnen Genen im Text aus der NCBI-Datenbank.

3.2.3 Ergebnisse der Sequenzierung und Auswertung der Sequenzen

3.2.3.1 IL-8

Das im Sequenzvergleich der untersuchten DNA-Abschnitte am häufigsten gefundene Gen ist das IL-8. Der sequenzierte Strang weist in seiner gesamten Länge eine sehr hohen Übereinstimmung zu einem Abschnitt der mRNA für IL-8 auf. Der Erwartungswert als Wert für die Wahrscheinlichkeit, daß die gefundene Sequenz der Suchanfrage entspricht, ist denkbar klein.

Das Gen für IL-8 liegt auf Chromosom 4 (4q12-q13), und gehört zur Gruppe der Chemokine (CXC).

IL-8 ist ein chemotaktischer Faktor, der einen Reiz auf Neutrophile, Basophile und T-Zellen ausübt. Außerdem ist er in die Aktivierung von Neutrophilen involviert. Er wird in einer Vielzahl von Zelltypen als Antwort auf einen Entzündungsreiz gebildet.

NP 2

```
AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTACCATGAAATATCCAGAACATACTTATATTTAAAt
TaTTATTTAtWHHWWTYTACAAAAACAACAAATAATTTTAAATATAAgGATTTTCCT
AGATATTGCACGGGAGAATATACAAATAGCAAAATTGAGGCCAAGGGCCAAGAGAA
TATCCGAAC TTAAATTCAGGAATTGAATGGGT TTKCTAGARTGTGATATTTGAAGCA
TCACATAAAAAATGATGGGACAgTAAATKTTGCcATAAAGTCAAATTTAGCTGGAAATC
CTGGRTTTTKTTcTGT TAAATCTGGCAACCCTAGTCTGCTAgCCAgGYTcACAAgTCCT
TGTTCCACTGTGCC TTGGTTTCTCCTTTATTTCTAAGTgGAAAAABTATTA tCCACCATC
TTHcCTCACAGTGATGTTGTGAGGACATGTGGAAGCACTTTAAGTtTTTTTCATCATAA
CATAAAATTATTTTCAAGTGTAAC TTAA
```


3.2.3.2 Calpain

Calpain wurde insgesamt zweimal gefunden. Das Insert, flankiert durch beide Nested-Primer, entspricht in seiner gesamten Länge einem Abschnitt der mRNA der großen Untereinheit von Calpain 2. Die Übereinstimmungen mit der gefundenen Sequenz sind sehr hoch, und der Wert für die Wahrscheinlichkeit, daß die Suchanfrage Calpain entspricht, mit e^{-119} sehr gut.

Die Calpain-Familie (durch Calcium aktivierbare neutrale Proteasen) sind nicht-lysosomale, intrazelluläre Cystein-Proteasen. Isoenzyme aus dieser Familie kommen ubiquitär (Calpain I, Calpain II) magen- (nCL-2) oder muskelspezifisch (p95) vor. Die Enzyme bestehen aus einer großen, katalytischen und einer kleinen, regulatorischen Untereinheit. Die gefundene Sequenz kodiert für die katalytische Untereinheit des ubiquitär vorkommenden Calpain II. Der Genort liegt auf Chromosom 1, q41-q42.

NP 2

AGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGTACATGAATTCCTATGAAATGCGGAAGGCATTAGA
AGAAGCAGGTTTCAAGATGCCCTGTCAACTCCACCAAGTCATCGTTGCTCGGTTTGCA
GATGACCAGCTCATCATCGATTTTGATAATTTTGTTCGGTGTTTGGTTCGGCTGGAAA
CGCTATTCAAGATATTTAAGCAGCTGGATCCCGAGAATATTGGAACATAGAGCTCGA
CCTTATCTCTTGGCTCTGTTTCTCAGTACCTGCCTCGGGCGGCCGCTCGA

NP 1

BLASTSearchResult

```

ref|NM_001748.1|CAPN2| Homo sapiens calpain, large polypeptide L2 (CAPN2)
mRNA
      gi|511636|gb|M23254|HUMCANP Human Ca2-activated neutral
      protease large subunit (CANP) mRNA, complete cds.
      Length = 3213

Score = 430 bits (217), Expect = e-119
Identities = 232/234 (99%), Gaps = 1/234 (0%)
Strand = Plus / Plus

Query: 2      catgaattcctatgaaatgcggaaggcattagaagaagcaggtttcaagatgccctgtca 61
            |||
Sbjct: 1993   catgaattcctatgaaatgcggaaggcattagaagaagcaggtttcaagatgccctgtca 2052

Query: 62      actccaccaagtcacgcgttgctcgggttgccagatgaccagctcatcatcgattttgataa
            |||
Sbjct: 2053   actccaccaagtcacgcgttgctcgggttgccagatgaccagctcatcatcgattttgataa 2112

Query: 122     ttttggttcggtggttggttcggctggaaacgctattcaagatatttaagcagctggatcc
            |||
Sbjct: 2113   ttttggttcggtggttggttcggctggaaacgctattcaagatatttaagcagctggatcc 2172

Query: 182     cgagaatattggaac-atagagctcgaccttatctcttggctctggtttctcagt 234
            |||
Sbjct: 2173   cgagaatactggaacaatagagctcgaccttatctcttggctctggtttctcagt 2226

```

3.2.3.3 MHC-bindendes Protein 2

Bei der folgenden Sequenz (mRNA MBP-2) konnten die Nested-Primer, die wahrscheinlich außerhalb des sequenzierten Abschnittes liegen, nicht gefunden werden. Der Erwartungswert ist entsprechend der relativen Kürze der Sequenz schlechter als bei den vorher beschriebenen Genen.

Das MHC-bindendes Protein (MBP-2) ist ein 275-kD-Protein und enthält zwei Zink-Finger Regionen, die an den MHC I Enhancer (Verstärker) binden, und eine Trans-Aktivations-Domäne. MBP-2 ist ein Transkriptionsfaktor, der in die Regulation der Expression von MHC I involviert ist (van't Veer et al., 1992). Das entsprechende Gen liegt auf Chromosom 6 (6q23-q24).

```

GCCCGTACCCACGGTTCCTTCAGATAGTTCCYTGGGACATTCTTCGTTGATCAGCTA
TTTGGTTACTTTTGCCAAGTATTTCGAGTTACTCAGCTTATGAAACCCAGARATAMAWGT
GAAGATACCCAGATGACAGAATACCAGAGGCTCTTCCCG

```

BLASTSearchResult

gi 38259	emb X65644.1	SSMBPROT2	H.sap. mRNA MBP-2 for MHC binding protein 2
Length = 9175			
Score = 238 bits (118), Expect = 7e-61			
Identities = 143/153 (93%), Gaps = 2/153 (1%)			
Strand = Plus / Plus			
Query: 3	ccgtacccac--ggttccttcagatagttccytgggacattcttcgttgatcagctatt	60	
Sbjct: 6032	ccgtacccacgggggttccttcagatagttccctgggacattcttcgttgatcagctatt	6091	
Query: 61	tggttactttgccaagtattcgagttactcagcttatgaaaccagaratamawgtgaag	120	
Sbjct: 6092	tggttactttgccaagtattcgagttactcagcttatgacacccagtgattcatgtgaag	6151	
Query: 121	ataccagatgacagaataaccagaggctcttcc	153	
Sbjct: 6152	ataccagatgacagaataaccagaggctattcc	6184	

3.2.3.4 β_2 -adrenerger Rezeptor

An der folgenden Sequenz wurde der Nested-Primer 1 gefunden. Das Insert kodiert mit einer Übereinstimmung von 90% und einem Erwartungswert von $2e^{-59}$ für den β_2 -adrenergen Rezeptor (β_2 -AR). Das Gen liegt auf Chromosom 5 (5q31-q32).

Der β_2 -AR gehört zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren und ist überall im Körper exprimiert. Er dient als Rezeptor für die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin.

ACAAATGACTCACTGCTATAAAGCAGT*TTTCTACT*TTTAAAGACCCCCCCCCGCCCAA
 CAGAACACTAAACAGACTATTTAACTTGAGGGTAATAAACTTAGAATAAAATTGTWH
 HHH*TTATAGAGATATGCAGAAGGAAGGGCATCCT*CTGCC*TTT*TTAT*TTT*TTAAG
 CTGTAAAAAGAGAGAAA*CTTATTTGAGTGATTATTTGTTATTTGTACCTGCCCCGGGC
 GGCCGCTCGA

NP 1

BLASTSearchResult

```

gb|J02960.1|HUMADRBRA Human beta-2-adrenergic receptor gene, complete cds
Length = 3458

Score = 234 bits (116), Expect = 2e-59
Identities = 142/157 (90%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1      acaaatgactcactgctataaagcagtttttctacttttaagannnnnnnnngcccaac 60
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 2485 acaaatgactcactgctataaagcagtttttctacttttaagaccccccccgcccaac 2544

Query: 61      agaacactaaacagactatttaacttgagggttaataaacttagaataaaaattgtwhhhht 120
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 2545 agaacactaaacagactatttaacttgagggttaataaacttagaataaaaattgtaaaatt2604

Query: 121     ttatagagatatgcagaaggaagggcatccttctgcc 157
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 2605 gtatagagatatgcagaaggaagggcatccttctgcc 2641

Score = 99.2 bits (49), Expect = 7e-19
Identities = 49/49 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 172     aagctgtaaaaagagagaaaaacttatttgagtgattatttgttatttgt 220
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 2656 aagctgtaaaaagagagaaaaacttatttgagtgattatttgttatttgt 2704

```

3.2.3.5 M-Phase Phosphoprotein-1

Auch an der nächsten Sequenz konnte der Nested-Primer 1 gefunden werden. Die Sequenz zeigt eine hohe Übereinstimmung und einen guten Erwartungswert mit der mRNA für das M-Phase Phosphoprotein-1.

Die Entwicklung von Zellen aus der Inter- zur Mitosephase beinhaltet die Veränderung von zellulären Strukturen und Aktivitäten. Der Übergang aus der G2- zur M-Phase wird durch M-Phase-Promoting Faktoren (MPF) induziert. In der M-Phase werden viele Proteine direkt durch MPF oder durch Kinasen, die durch MPF aktiviert werden, phosphoryliert. Diese M-Phase Phosphoproteine erlauben den Umbau von Interphase-Strukturen und den Aufbau von enzymatischer Aktivität und Strukturen der M-Phase. Zu diesen gehört das M-Phase Phosphoprotein-1 (MPP1 oder MPHOSPH1), das auf Chromosom 10 (10q23) kodiert wird.

AAAATTACGGGGTATGTGAGATGTTTGTGACACAGGCATGCAATGTGAAATACGTGT
 ATCATGGAGAATGAGGTATCCATCCCCTCAAGCATTTTTCCTTGAATTACAKATAATC
 CAATTACATTCTTTAGATCATTTAAAAATATACAAGTAAGTTATTATTGATTATAGTCA
 CTCTATTGTGCTATCAGATAGTAGATCATTTCTTTTATCTTATTGTGTTTTGTACCAGC
 CCGGGCGGCCGCTCGA

NP 1

BLASTSearchResult

gi 13644487 ref XM_005803.3 	Homo	sapiens	M-phase	phosphoprotein	1
(MPHOSPH1), mRNA					
Length = 6276					
Score = 449 bits (226), Expect = e-124					
Identities = 227/228 (99%)					
Strand = Plus / Plus					
Query: 4	atttacgggggatgtgagatgttttgacacaggcatgcaatgtgaaatacgtgtatcatg	63			
Sbjct: 5917	atttacgggggatgtgagatgttttgacacaggcatgcaatgtgaaatacgtgtatcatg	5976			
Query: 64	gagaatgaggtatccatcccctcaagcatttttcctttgaattacakataatccaattac	123			
Sbjct: 5977	gagaatgaggtatccatcccctcaagcatttttcctttgaattacagataatccaattac	6036			
Query: 124	attcttttagatcatttaaaaatatacaagtaagttattattgattatagtcactctattg	183			
Sbjct: 6037	attcttttagatcatttaaaaatatacaagtaagttattattgattatagtcactctattg	6096			
Query: 184	tgctatcagatagtagatcattctttttatcttatttgTTTTGTACC	231			
Sbjct: 6097	tgctatcagatagtagatcattctttttatcttatttgTTTTGTACC	6144			

3.2.3.6 Cosmid F0811

Bei der nächsten Sequenz konnten keine Nested-Primer gefunden werden. Sie ist insgesamt sehr kurz (135 Nukleotide), was sich zusammen mit den gefundenen Übereinstimmungen von nur 87% auch im relativ schlechten Erwartungswert widerspiegelt. Es wird eine Übereinstimmung mit menschlicher DNA aus dem Cosmid F0811 auf Chromosom 6, 6p21.3, angegeben. Aufgrund der schlechten Werte und der fehlenden Übereinstimmung im ersten Teil der Suchanfrage scheint das Ergebnis eher fraglich und wurde in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

GAAGAAACAAGATAAAATATAAAAAGAATAAGATANCNTAGATAAKCTAATAATTCT
 GGTCCCGTGTCTGNRATGCTTGGGTSAGAAGTGTTTTGGATGTTGGATTITGTCAG
 AGGTGGGAANATTGCRATA

BLASTSearchResult

```
emb|Z97184.1|HSF0811 Human DNA sequence from cosmid F0811 on chromosome 6.
Contains Daxx,
          BING1, Tapasin, RGL2, KE2, BING4, BING5, ESTs and CpG
          islands
          Length = 40127

Score = 111 bits (55), Expect = 7e-23
Identities = 81/93 (87%)
Strand = Plus / Plus

Query: 43  taaktaataattctggtcccggtgtctgnratgcttgggtsagaagtgttttggatgtt 102
          ||| |||||||||||||||| | ||||  ||||||||| |||||||||||||||||
Sbjct:17468taatctaataattctggtcccttatctgaaatgcttgggtcagaagtgttttggatgtt 17527

Query: 103  ggattttgtcagaggtgggaanatttgcertata 135
          ||||||| ||||| | |||| |||||| ||||
Sbjct: 17528 ggattttttcagacttttgaatatattgcatata 17560
```

3.2.3.7 ect2-Oncogen

Beim Sequenzieren der nächsten Sequenz konnten wieder beide Nested-Primer gefunden werden. Das Insert entspricht mit einer Ausnahme von drei Nukleotiden nahezu vollständig einem Teil der cDNA FLJ13205 fis. Diese stimmt in hohem Maße mit der Mouse oncogene (ect2) mRNA überein. Man geht davon aus, daß das entsprechende Mausgen auch bei Menschen existiert.

Das ect2-Protein besitzt eine hohe Ähnlichkeit mit bcr, CDC24 und dem dbl-Oncogen. Diese kodieren alle für regulatorische Moleküle oder Effektoren für Rho-ähnliche kleine GTP-Bindungsproteine. Das ect2-Oncogen stellt ein neues Mitglied einer größer werdenden Familie dar, deren Produkte transformierende Eigenschaften haben und mit Rho-ähnlichen Proteinen der Ras-Superfamilie interagieren. Das Gen ist auf Chromosom 3(3q26.1-q26.2) lokalisiert.

NP 2

AGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGTACTATGCTTTACTGGATTTAGGAANANAGAAGA
 ACTAGTCAGGTTGGTGACATTGGTCCATCACATGGGTGGAGTTATTCGAAAAGACTT
 TAATTCAAAAAGTTACACATTTGGTAGCAAATTGTACCTGCCCCGGGCGGCCGCTCGA

NP 1

BLASTSearchResult

```
dbj |AK023267.1|AK023267 Homo sapiens cDNA FLJ13205 fis, clone NT2RP3004534,
highly similar
      to Mouse oncogene (ect2) mRNA
      Length = 2424

Score = 226 bits (114), Expect = 2e-57
Identities = 121/124 (97%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1  actatgctttactggatttaggaananagaagaactagtcagggttggtgacattggtcca 60
      |||
Sbjct: 475 actatgctttactggatttaggaaaaagaagaactagtcagggttggtgacattggtcca 534

Query: 61  tcacatgggtggagttattcgaaaagactttaattcaaaagttacacatttggttagcaaaa 120
      |||
Sbjct: 535 tcacatgggtggagttattcgaaaagactttaattcaaaagttacacatttggtggcaaaa 594

Query: 121 ttgt 124
      |||
Sbjct: 595 ttgt 598
```

3.2.3.8 Methionin-Adenosyltransferase alpha

Auch bei der folgenden Sequenz konnten wieder beide Nested-Primer gefunden werden. Sie wurde, bis auf einen kurzen Abschnitt am Ende des Inserts, mit guten Übereinstimmungen und gutem Erwartungswert als Methionin-Adenosyltransferase alpha-Untereinheit identifiziert.

Die Methionin-Adenosyltransferase katalysiert die Biosynthese von S-Adenosylmethionin aus Methionin und ATP. Das Gen ist auf Chromosom 2 (2p11.2) zu finden.

NP 2

ACGGCGTGGTGCGGAGGGCCGTACTTACGCCATACCCCAGAATACAATAAATAAGCA
 ATTAGAAAACGTTCAAGTATGAAGGGATTTCCTCCTCCCCGCCAAAAGCACTGCTCTC
 TCAAGGAAGCTTGTTTCTCTGTACCTACACCACCTGTTTACAGAAAGCTCATTTGGACCTG
 GTTTTGAAAATAAAACAAAGTTAAAACCTGGGAGGAGTTATCTCGTCGCAGTGTGGA
 ATACCTGTTTGGGCGGCCGCTCGA

NP 1

BLASTSearchResult

```

gb|L43509.1|HUMMEADF Homo sapiens methionine adenosyltransferase alpha
subunit gene
      fragment
      Length = 2693

Score = 335 bits (169), Expect = 5e-90
Identities = 188/193 (97%), Gaps = 1/193 (0%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1      acttacgccataccccagaatacaataaataagcaattagaaaacggttcaagtatgaagg 60
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 2316 acttacgccataccccagaatacaataaataagcaattagaaaacggttcaagtatgaagg 2257

Query: 61      gatttcctcctccccgccaaaagcactgctctctcaaggaagcttggtttctctgtaccta 120
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:2256 gatttcctcctccccgccaaaagcactgctctctaaaggaagctgggtttctctgtagcta 2197

Query: 121     caccacctgttcagaaagctcattggacctgggtttgaaaataaaaacaaagttaaaa-cc 179
      ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct:2196 caccagctgttcagaaagctcattggacctgggtttgaaaataaaaacaaagttaaaaccc 2137

Query: 180     tgggaggagttat 192
      ||||||||||||
Sbjct: 2136 tgggaggagttat 2124

```

3.2.3.9 PAC-Klon

Von der nächsten Sequenz wurden fast 800 Nukleotide sequenziert. Allerdings konnten weite Abschnitte, trotz mehrfacher Sequenzierungsversuche, nicht eindeutig zugeordnet werden. Übereinstimmungen sind nur für ein kurzes Stück (46 Nukleotide) mit der 3p21.3-4 PAC RP4-751E10 Sequenz gefunden worden. Der Erwartungswert ist dementsprechend schlecht, so daß weitere Untersuchungen zur Einordnung des Ergebnisses notwendig sind.

CGCMGARKTgCGcGCGTTCtGAGCSGCCGCSCGGGCAGGTACAGCTTTTtHtTTTtT
 TTTTtTTTtTARAAGAgACcAGATTTCgCCACSTTGGCCCSgVTGGTCYARMCAATTtT
 TTTTtTTTtTATNNNNNNANNTcGAcCWCA~~ca~~AARWGCTGGGATTACAGGTGTGAGCC
ACCGCACCCAGCCAAAAATATGAGGCTTTTCTCAATCAATCYATGACGtGCAGAcTGTCC
 CAAGAAAAGtAAGAAgCTTTCAGAGNCACTCGNAGTTAAaaaTCccTCAtTTGKRAGAaTCAT
 ATGcCAGACcYTAGGGCTCTGCCTTACTCTCGCAATARCTGAagGGAAAATAAAAtCTgTT
 GATATAAAcMBACGAAGCATTTGKTAAaATAGATGGGAANNNCCNNNNNGCNNNNNC
 cCCTTAAtCCGTtCACAGATATgCACaGcTGTGTGcTACACAGNANGNCNGCCGGACNCA
 CAANCSSAGNTGGGGTCTGNCCTTAAATTTCAAATTAAAACaTTtAAAaaAGATTGTgGA
 CTCAAATAGAACKAAGAAGACTCCTcTATGGCTAGAAATGGNATTGTAATTTTVATctT
 CGGAAAACtACACAGATTCTAAAAGAATAAAGTAACACAAANTGNNTNNNANNNGN
 CAaANNGNCNNNAANNCAAAACCAAGANTCTCAATCTCCACAGNtCGTATTTCAAGCA
 AAACCKGAGTANTANTGGGCNAGTGGTANCAgCAGANTANtgAANGACTANNGNNN
 NGANNNNcNgCNCGCCcCCCctCNNNCN

BLASTSearchResult

[gb|AC005923.2|AC005923](#) Homo sapiens 3p21.3-4 PAC RP4-751E10 (Roswell Park
 Cancer Institute
 Human PAC Library) complete sequence
 Length = 88326

 Score = 86.1 bits (42), Expect = 2e-14
 Identities = 44/46 (95%)
 Strand = Plus / Plus

 Query: 152 caaarwgctgggattacaggtgtgagccaccgcacccagccaaaat 197
 |||| |
 Sbjct: 2610 caaagtgtgggattacaggtgtgagccaccgcacccagccaaaat 2655

3.2.3.10 ERM-Gen

Bei der nächsten Sequenz handelt es sich um das Exon 13 des ERM-Gen. Die Nested-Primer konnten nicht gefunden werden. Die Sequenz entspricht aber dem oben benannten Gen, mit sehr guten Übereinstimmungen und Erwartungswert.

Das ERM-Gen gehört zur Familie der Ets-verwandten Transkriptionsfaktoren. Es ist überall im Körper exprimiert, besonders hoch in Hirngewebe und Plazenta. Das Erm-Gen beinhaltet 14 Exons und ist auf Chromosom 3 (3q27-q29) lokalisiert worden.

ACATTAAGAATGACTACACTGTTCTCGTATGTGAAGGAGGCAGTGCTGACTCCGTG
 AGTGTGAGACACGTGCTTTGAACTGCTTTTCTATTCATGGAGCACTCCATAGTCTMAA
 ACTGTCCCCCTTATGACCAACAGCACATTTGTGAAGAGGTTTCGCAGGGATAAGGGGT
 GCACTTTATAGCTATGGAAACATGAGATTCTCCTYTATKBNNTKCTNATTAGCCCACA
 AAGGTGGTAAACCTGTAGATTGGGCCTTAATTAGCATTTGT

BLASTSearchResult

[emb|X96375.1|HSERM13](#) H.sapiens erm gene, exon 13

Length = 2598

Score = 496 bits (247), Expect = e-138

Identities = 261/270 (96%)

Strand = Plus / Plus

```

Query: 1      acattaagaatgactacactgttcctcgtatgtgaaggaggcagtgctgactccgtgagt 60
             |||
Sbjct: 1775  acattaagaatgactacactgttcctcgtatgtgaaggaggcagtgctgactccgtgagt 1834

Query: 61      gtgagacacgtgctttgaactgcttttctattcatggagcactccatagtctmaaactgt 120
             |||
Sbjct: 1835  gtgagacacgtgctttgaactgcttttctattcatggagcactccatagtctcaaactgt 1894

Query: 121     ccccttatgaccaacagcacatttgtgaagagggttcgcagggataaggggtgcacttta 180
             |||
Sbjct: 1895  ccccttatgaccaacagcacatttgtgaagagggttcgcagggataaggggtgcacttta 1954

Query: 181     tagctatggaaacatgagattctcctytatkbnntkctnattagcccacaaaggtggtaa 240
             |||
Sbjct: 1955  tagctatggaaacatgagattctcctctatttgaagctaattagcccacaaaggtggtaa 2014

Query: 241     acctgtagattgggccttaattagcattgt 270
             |||
Sbjct: 2015  acctgtagattgggccttaattagcattgt 2044

```

3.2.3.11 PVT

An der nächsten Sequenz wurden wieder beide Primer identifiziert. Der relativ schlechte Erwartungswert ergibt sich aus dem unsauber sequenzierten Teil im mittleren Abschnitt der Sequenz. Die Übereinstimmungen für die äußeren Abschnitte sind aber sehr hoch.

Das Gen wird als „Human transcription unit PVT“ bezeichnet und ist auf Chromosom 8 (8q24) lokalisiert. Seine Funktion ist noch weitgehend unklar, es scheint aber ein Zusammenhang mit dem Burkitt-Lymphom zu bestehen. Die chromosomalen Translokationen des Burkitt-Lymphoms liegen

typischerweise im oder nahe des myc-Protooncogens, oft aber auch in der Region des PVT-Gens, und es wird angenommen, daß seine gestörte Funktion die Tumorentstehung fördert (Shtivelman et al. 1989).

NP 2

AGGGCGTGGTGC GGAGGGCGGTACAGACCCTTAGGTCTGGTCTTAGGCCTGTTTCA
 ATACATCTWTTTCATCTTCTCTGTTAGCACATGGCMTNNNNNNNNNTTTTAACTAWAAA
 AAWCACAGTGTAATGGCAGTAAAAGGGGAACACCAAGGGAGCYACGTGCCAAGCAG
 CTCATWAATWWAGTGATTCAGCCTCCACTTAAAGTACCTGCCCGGGCGGCCGCTCRA

NP 1

BLASTSearchResult

```
gb|M34428.1|HUMPVTA Human transcription unit PVT gene, exons I-III
      Length = 1536

Score = 114 bits (56), Expect = 1e-23
Identities = 66/68 (97%), Gaps = 1/68 (1%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1   acagacccttaggtctgggtcttaggcctgtttcaatacatctwtccatcttctctgtag 60
          |||
Sbjct: 841 acagacccttaggtctgggtcttaggcctgtttcaat-catctcttccatcttctctgtag 783

Query: 61   cacatggc 68
          |||
Sbjct: 782 cacatggc 775

Score = 57.7 bits (28), Expect = 2e-06
Identities = 32/34 (94%)
Strand = Plus / Minus

Query: 106  tggcagtaaaaggggaacaccaagggagcyacgt 139
          |||
Sbjct: 736 tggcagtaaaaggggaacaccaagggggccacgt 703

Score = 38.0 bits (18), Expect = 0.28
Identities = 18/18 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 162  tgattcagcctccactta 179
          |||
Sbjct: 678 tgattcagcctccactta 661
```

3.2.3.12 Metallopanstimulin

Die folgende Sequenz, die insgesamt zweimal gefunden wurde, konnte ab Nukleotid 122 als mRNA für Metallopanstimulin von *Strongyloides ratti* (Fadenwurm) identifiziert werden. An der Sequenz, bei der nur der Nested-Primer 2 gefunden wurde, erkennt man, vor allem am Ende, eine nur sehr ungenaue Zuordnung zu einzelnen Nukleotiden, was sich auch im schlechten Erwartungswert bemerkbar macht. Die Zuordnung der Sequenz zu *Strongyloides ratti* beruht auf der schlechten Sequenzierung, so daß es sich eher um das entsprechende Gen beim Menschen handelt. Aus dem ersten, nicht Metallopanstimulin zugeordnetem Teil, werden einzelne, kurze Abschnitte verschiedenen Klonen zugeordnet.

Metallopanstimulin kodiert für ein Metalloprotein, welches in einer Vielzahl von Zellen, die aktiv proliferieren, oder in Tumorgewebe exprimiert wird. Es enthält eine Zink-Finger-Domäne vom C4-Typ (ähnlich denen, die in Proteinen der Superfamilie der Steroid-Hormon-Rezeptoren vorhanden sind). Es wird angenommen, daß Metallopanstimulin eine wichtige Rolle als Vermittler zellulärer proliferativer Antwort auf verschiedene Wachstumsfaktoren und anderer Signale der Umgebung spielt. Es wird auf Chromosom 1, 1q21, kodiert.

NP 2

AGgGCgTGGTGCgGAGGGGCGGTCAAACATTTCTNtTTGCAAAATACCAAAACcCCATTC
TCCAGCTCCCTGAATGctAACtACCCCAAATAACAGAGGGCAGCAACCACAGGGAACTA
CAGCTTTAATCtGTACCTGCCCCGGGcgGCCGCTCCGAAGCCGAATTCCAGCACACTGG
CGGCCCNtACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAgCTTgGCgTNAATCATgGNYATAN
NTGTtNNYYtNCNYYNYTCGTtATCCGCTCACAcTTCCcCcCcCCCTCNCGNCTNNTTNNCT
NgTCTNTNTNCTATCATATTGGTGSACCCcCttCcTCGMCCcT

BLASTSearchResult

emb AJ001134.1 SRMETPANS <i>Strongyloides ratti</i> mRNA for metallopanstimulin Length = 448 Score = 135 bits (67), Expect = 1e-29 Identities = 81/86 (94%) Strand = Plus / Minus	
Query: 112	cctgccccggggcgccgctccgaagccgaattccagcacactggcgcccntactagtgga 171
Sbjct: 89	cctgccccggggcgccgctcgaaagccgaattccagcacactggcgcccggttactagtgga 30
Query: 172	tccgagctcggtaccaagcttggcgt 197
Sbjct: 29	tccgagctcggtaccaggcttggcgt 4

3.2.3.13 Decarboxylase-Antizyme 2

Die folgende Sequenz konnte in voller Länge des Inserts (flankiert von beiden Primern) dem Ornithin-Decarboxylase-Antizyme 2 zugeordnet werden. Übereinstimmungen und Erwartungswert sind sehr gut.

Das Ornithin-Decarboxylase-Antizym 1 ist ein Regulator des Polyamin-Spiegel. Es wirkt durch Destabilisierung des ersten Enzyms (Ornithin-Decarboxylase, ODC) in der Polyamin Biosynthese. Außerdem verhindert es die Aufnahme von Polyamin. Es wird angenommen, daß die Polyamine für die transkriptionale und translationale Regulation der ODC-Antizyme eine Rolle spielen. Ebenso zeigt das ODC-Antizym 2 die charakteristische Inhibition der ODC, auch wenn es die Degeneration der ODC nicht beschleunigt.

Es ist ubiquitär im Körper exprimiert und auf Chromosom 15 (15q11.2) kodiert.

NP 2

GTGGTGCGGAGGGCGGTACTATACTCAGCCAGCCAGAAAGTATCCAGTCCCTAAGAAC
GGATTGCCCCACAATTCCCAGGCCCTGAGTTGCTATATATTCTCTTCCTTACTGCTGT
TTGTGACCCCAAGAAGAGRACCATGGGGCCTGGGCCTGCAGCCAGGAGCAAGAAGT
CCTGGCAGTGATTGTGAGAATAATAATATAGAGTTTGGCTAGTGTTTAAAGGCCAGGC
ATCCCCCAAAAAAGCCCTGGTGGTGGGAGTAAATTTCAATGCCCTATTAAAAATGTA
CCTGCCCCGGGCGGCCGCTCGA

NP 1

BLASTSearchResult

```

gi|13652827|ref|XM_012447.2| Homo sapiens ornithine decarboxylase antizyme 2
(OAZ2), mRNA
      Length = 1522

Score = 477 bits (240), Expect = e-132
Identities = 264/270 (97%), Gaps = 2/270 (0%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1      actatactcagccagccagaagtatccagtcctaagaacggattgccccacaattccca 60
             |||
Sbjct: 1299   actatactcagccagccagaagtatccagtcctaagaacggattgccccacaattccca 1240

Query: 61      ggccctgagttgctatatattcctcttccttactgctgtttgtgacccaagaagagrac 120
             |||
Sbjct: 1239   ggccctgagttgctatatattcctcttccttactgctgtttgtgacccaagaaggagac 1180

Query: 121     catggggcctgggcctgcagccaggagcaagaactcctggcagtgatttgagaatataat 180
             | |||
Sbjct: 1179   cttggggcctgggcctgcagccaggagcaagaactcctggcagtgatttgagaat-taat 1121

Query: 181     atagagtttggttagtggttttaaaggccagggcatcccccaaaaaagccctggtggtggg 240
             |||
Sbjct: 1120   -tagagtttggttagtggttttaaaggccagggcatcccccaaaaaagccctggtggtggg 1062

Query: 241     agtaaatttcaatgccctattttaaagt 270
             |||
Sbjct: 1061   agtaaatttcaatgccctattttaaagt 1032

```

3.2.3.14 Interferon- γ Rezeptor 2

Die letzte Sequenz ist in voller Länge dem Interferon- γ Rezeptor 2 zugeordnet worden. Der Erwartungswert ist aufgrund der relativen Kürze der Sequenz gering, die Übereinstimmungen sind jedoch sehr gut.

Der Interferon- γ Rezeptor ist für die zelluläre Antwort auf Interferon- γ unentbehrlich. Interferon- γ gehört zur Gruppe der Cytokine. Diese haben eine Vielzahl autokriner und/oder parakriner Funktionen durch die Aktivierung intrazellulärer Second-messenger Signalwege zu verantworten. Vor allem spielen sie bei entzündlichen Prozessen, aber auch anderen Fehlfunktionen eine Rolle.

Das Gen wird auf Chromosom 21 (21q22.1-q22.2) kodiert.

NP 2

AGGGGCGTNGGNTGCGGGAGGGCGGTACAATTCACCCCTATGGACATGATGTCGG
 CCGTGAACCATTTACTGTCGGTGTATTTAAACTGGCTCCCAACTCAGGACTGCTCTGC
 GTTGTACCTGCCCCGGGCGGCCGCTCGA

NP 1

BLASTSearchResult

```
gi|13177681|gb|BC003624.1|BC003624 Homo sapiens, interferon gamma receptor 2
(interferon gamma
  transducer 1), clone MGC:2193, mRNA, complete cds
  Length = 1722

Score = 125 bits (63), Expect = 4e-27
Identities = 63/63 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 1   acaattcacccctatggacatgatgtcggccgtgaaccatttactgtcgggtgtatttaa 60
          |||
Sbjct: 383 acaattcacccctatggacatgatgtcggccgtgaaccatttactgtcgggtgtatttaa 324

Query: 61   ctg 63
          |||
Sbjct: 323 ctg 321

Score = 52.0 bits (26), Expect = 5e-05
Identities = 33/34 (97%), Gaps = 1/34 (2%)
Strand = Plus / Minus

Query: 60   actggctcccaactcaggac-tgctctgcggtgt 92
          |||
Sbjct: 280 actggctcccaactcaggacctgctctgcggtgt 247
```

3.2.3.15 Besonderheiten bei der Auswertung der Sequenzierungsergebnisse

Diese 14 hier beschriebenen Gene wurden in unterschiedlicher Häufigkeit gefunden. Interleukin-8 wurde 15 mal identifiziert, Metallopanstimulin, alpha-2 Kollagen und Calpain jeweils zweimal. Alle anderen Gene wurden jeweils einmal gefunden.

Drei Klone konnten nicht sequenziert werden, bei acht waren die Ergebnisse der Sequenzierung auch in Wiederholungen so unsauber, daß von einer weiteren Untersuchung abgesehen wurde. Bei vier gefundenen Sequenzen handelte es sich um Klonierungsvektoren bzw. CA-repeat Regionen. Zwei weitere Gene („Human alpha-2 collagen type VI gene“, „Human ribosomal DNA complete

repeating unit“), von denen das erste zweimal gefunden wurde, konnten in der Northernblot-Analyse nicht dargestellt werden, so daß hier auch auf eine Sequenzdarstellung verzichtet wird.

3.3 Radioaktive Northernblot-Analyse

Um zu überprüfen, ob die gefundenen Gene tatsächlich differentiell exprimiert werden, wurden radioaktiv markierte Sonden hergestellt und mit von zuvor unterschiedlich behandelten Zellen gewonnener, auf eine Nitrocellulosemembran gebundene RNA hybridisiert.

Zunächst wurden LN-405 Zellen in einer Zeitreihe (30, 60, 120, 240 und 480 Minuten) mit TPA bzw. 240 Minuten mit Chelerythrin und 240 Minuten mit PTHrP behandelt. Eine Zellkulturflasche blieb unbehandelt. Die Kontrollen für die anderen Zelllinien (U-138, GAMG, U-87) wurden jeweils nur für 240 Minuten behandelt.

Von diesen Zellen wurde die RNA extrahiert und 10 µg auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Da die Ausbeute an RNA für die verschiedenen Zelllinien unterschiedlich groß war, konnte nicht für jede Gensonde für alle Zelllinien eine Überprüfung durchgeführt werden. Vor dem Blotten der RNA auf die Membranen wurde deren Integrität durch Kontrolle unter UV-Licht sichergestellt. Ein Beispiel zeigt die Abb. 12.

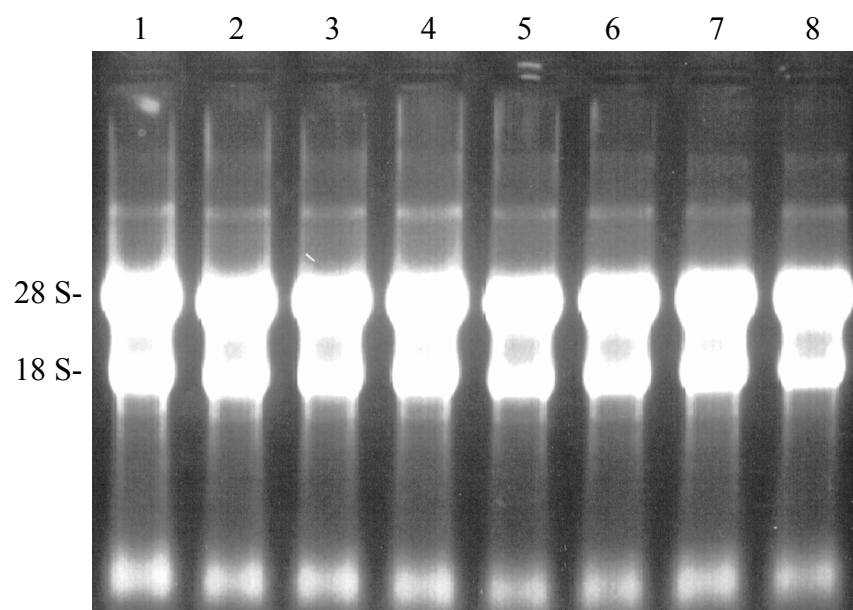


Abb. 12: RNA-Kontroll-Gel. 2%iges denaturierendes Agarosegel. Jeweils 10 µg RNA. (1: keine Behandlung, 2-6: TPA-Zeitreihe, 7: Chelerythrin behandelt, 8: PTHrP behandelt).

Um die Expressionsstärke der einzelnen Gene im Verlauf der Zeitreihe genau bestimmen zu können, ist es erforderlich, den Fehler zu minimieren, der durch Auftrag unterschiedlicher RNA-

Mengen entsteht. Trotz photometrischer Konzentrationsbestimmung der RNA kam es beim Auftragen auf die RNA-Gele zu Unterschieden bis zum Faktor 3. Alle Blots wurden daher mit der Sonde eines Housekeeping-Gens (G3PDH) hybridisiert und die Signalstärken bestimmt. Diese wurden in die Auswertung der spezifischen Gen-Sonden mit einbezogen.

Ein Beispiel für einen G3PDH-Northernblot zeigt die nachstehende Abbildung (Abb. 13).

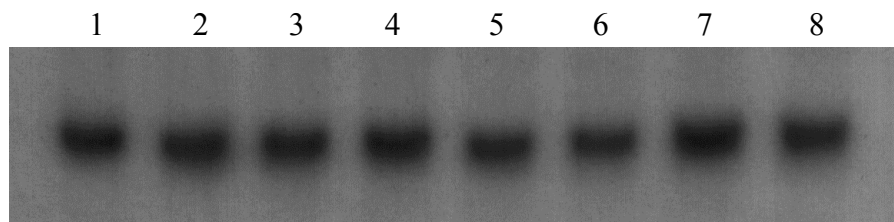


Abb. 13: Radioaktive Northernblot-Kontrolle. Blot mit 10 µg RNA pro Bahn. G3PDH-Sonde. (1: keine Behandlung, 2-6: TPA-Zeitreihe, 7: Chelerythrin behandelt, 8: PTHrP behandelt).

Die spezifischen Sonden für die radioaktive Northernblot-Kontrolle wurden durch PCR aus den Plasmiden gewonnen. Bevor die radioaktive Markierung erfolgte, wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel überprüft. Durch Auftragen der Marker in unterschiedlichen Konzentrationen konnte die ungefähre Konzentration der PCR-Fragmente abgeschätzt werden. Ein Beispiel für die durch PCR gewonnen Sonden zeigt Abb. 14.

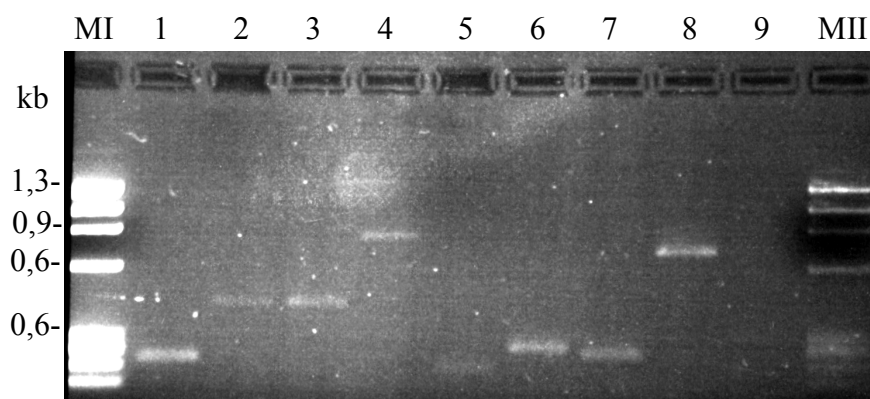


Abb. 14: PCR-Produkte für Sondenherstellung. 2%iges Agarosegel. M1: 1 µg ϕ X147/Hae III DNA-Längenmarker, MII: 0,2 µg ϕ X147/Hae III DNA-Längenmarker, 1: Methionin-Adenosyltransferase, 2: Cosmid F0811, 3: zugehörige Sequenz konnte nicht identifiziert werden, 4: Alpha-2-Kollagen, 5: PVT, 6: MPP1, 7: β_2 -adrenerger Rezeptor, 8: IL-8, 9: ERM-Gen.

In der Auswertung der Northernblot-Kontrolle werden Signalunterschiede ab dem Faktor 3 als differentiell exprimiert angenommen. In den nachfolgenden Ergebnissen der Northernblot-

Kontrollen für die gefundenen Gene kommen für die Zelllinie LN-405 die Abbildungen der Northernblots, die tabellarische Auswertung der Signalstärken und die Ergebnisse in Diagrammform zur Darstellung. Für die Versuche an den drei anderen Astrozytomzelllinien werden nur die Ergebnisse in Form der Diagramme gezeigt.

3.3.1 Interleukin-8

In der Auswertung der Signalunterschiede erkennt man im Verlauf der Zeitreihe einen deutlichen Anstieg der Expression von IL-8 nach TPA-Behandlung von LN-405-Zellen. Chelerythrin- und PTHrP-Behandlung haben keinen Anstieg der Expression zur Folge.

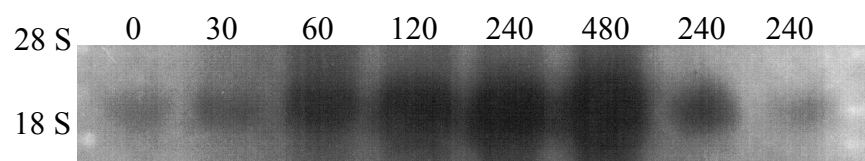


Abb. 15: Radioaktiver Northernblot - Sonde IL-8. Zelllinie LN-405. (0: keine Behandlung, 30-480: Behandlungszeiten TPA in min, 240: Behandlungszeit Chelerythrin in min, 240: Behandlungszeit PTHrP in min)

Tabelle 3: Auswertung der Signalunterschiede IL-8. Zelllinie LN-405.

LN-405		TPA	TPA	TPA	TPA	TPA	Chel	PTHrP	LW
t [min]	0	30	60	120	240	480	240	240	
Rohwerte	394	458	653	684	747	844	490	375	287
RW-LW	107	171	366	397	460	557	203	88	0
RW-LW(G3PDH)	739	613	630	530	433	428	550	442	0
IL-8/G3PDH	0,14	0,28	0,58	0,75	1,06	1,30	0,37	0,20	
/0,14	1,0	1,9	4,0	5,2	7,3	9,0	2,6	1,4	

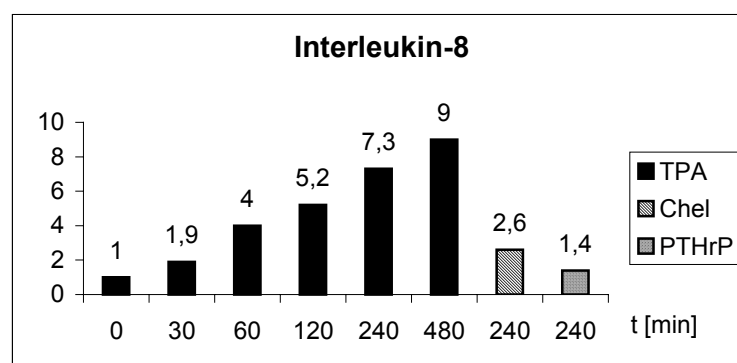


Diagramm 1: Darstellung der Signalunterschiede IL-8. Zelllinie LN-405.

Auch in 2 von 3 der weiterhin untersuchten Zelllinien (U-87, GAMG) ist ein Anstieg der Expression von IL-8 nach TPA-Behandlung zu beobachten.

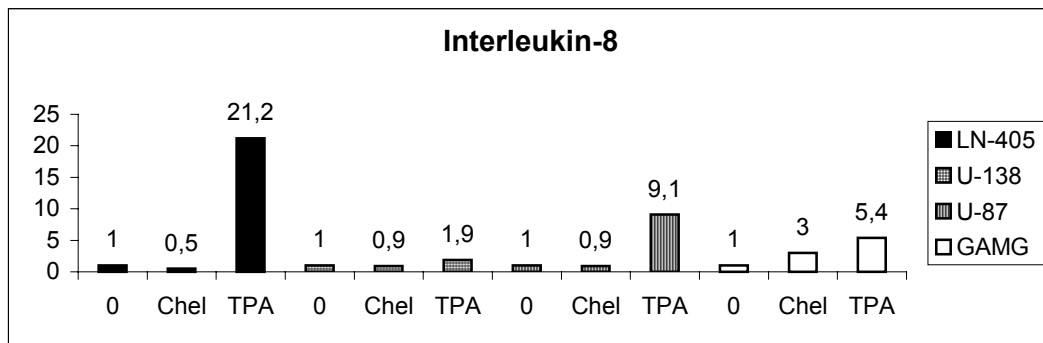


Diagramm 2: Darstellung der Signalunterschiede IL-8. Zelllinien LN-405, U-138, U-87 und GAMG.

3.3.2 Calpain

Die Behandlung mit TPA führt in LN-405-Zellen zu einer Verstärkung der Calpain-Expression. PTHrP-Behandlung hat eine verminderte Expression von Calpain zur Folge.

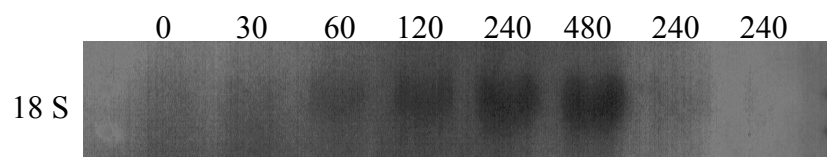


Abb. 16: Radioaktiver Northernblot - Sonde Calpain. Zelllinie LN-405. (0: keine Behandlung, 30-480: Behandlungszeiten TPA in min, 240: Behandlungszeit Chelerythrin in min, 240: Behandlungszeit PTHrP in min)

Tabelle 4: Auswertung der Signalunterschiede Calpain. Zelllinie LN-405.

LN-405		TPA	TPA	TPA	TPA	TPA	Chel	PTHrP	LW
t [min]	0	30	60	120	240	480	240	240	
Rohwerte	734	753	782	803	845	849	740	718	705
RW-LW	29	48	77	98	140	144	35	13	0
RW-LW (G3PDH)	726	710	753	653	677	613	516	543	0
Calpain/G3PDH	0,04	0,07	0,10	0,15	0,21	0,23	0,07	0,02	
/0,04	1,0	1,7	2,5	3,7	5,1	5,8	1,7	0,6	

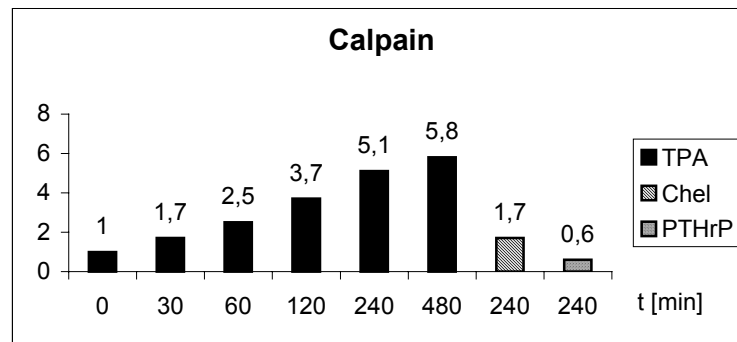


Diagramm 3: Darstellung der Signalunterschiede Calpain. Zelllinie LN-405.

Bei der Auswertung der anderen drei Zelllinien zeigt sich bei einer (U-87) ein Anstieg der Expression von Calpain nach TPA-Behandlung, bei einer zweiten (GAMG) ein grenzwertiger.

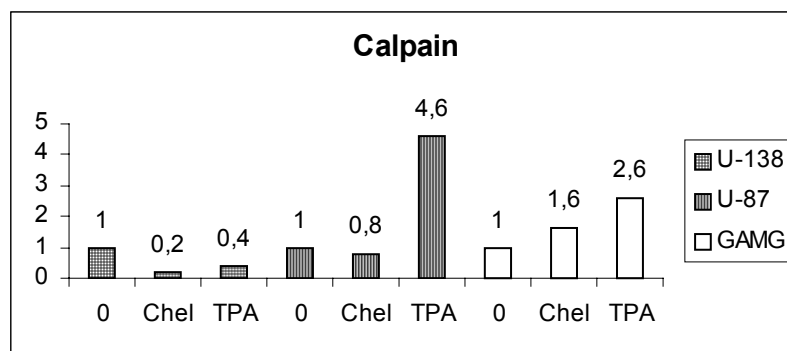


Diagramm 4: Darstellung der Signalunterschiede Calpain. Zelllinie U-138, U-87 und GAMG.

3.3.3 MHC-bindendes Protein 2

Für MBP-2 ist ein deutlicher Anstieg der Expression nach TPA-Behandlung von LN-405-Zellen zu erkennen. Keinen Einfluß auf die Expression haben Chelerythrin und PTHrP.

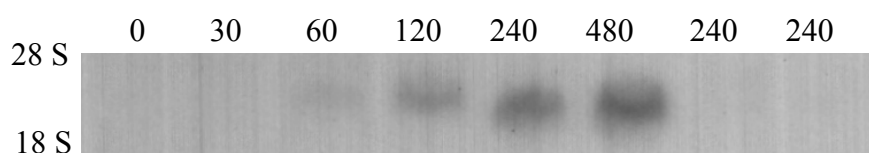


Abb. 17: Radioaktiver Northernblot - Sonde MBP-2. Zelllinie LN-405. (0: keine Behandlung, 30-480: Behandlungszeiten TPA in min, 240: Behandlungszeit Chelerythrin in min, 240: Behandlungszeit PTHrP in min)

Tabelle 5: Auswertung der Signalunterschiede MBP-2. Zelllinie LN-405.

LN-405		TPA	TPA	TPA	TPA	TPA	Chel	PTHrP	LW
t [min]	0	30	60	120	240	480	240	240	
Rohwerte	176	178	192	221	253	290	191	190	151
RW-LW	25	27	41	70	102	139	40	39	0
RW-LW(G3PDH)	883	868	842	826	874	848	807	742	0
MBP-2/G3PDH	0,03	0,03	0,05	0,08	0,12	0,16	0,05	0,05	
/0,03	1,0	1,1	1,7	3,0	4,1	5,8	1,8	1,9	

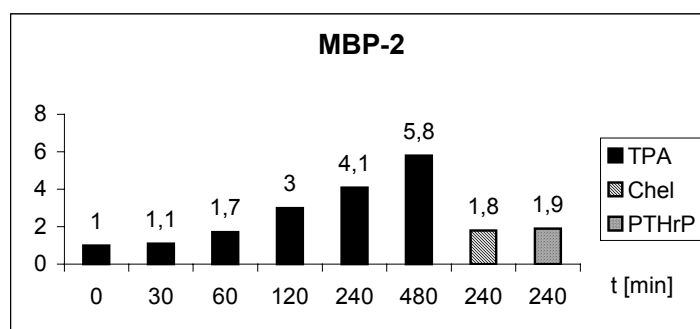


Diagramm 4: Darstellung der Signalunterschiede MBP-2. Zelllinie LN-405.

In der Auswertung für die anderen beiden Zelllinien (U-87, U-138) sieht man ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Expression von MBP-2 nach TPA-Behandlung.

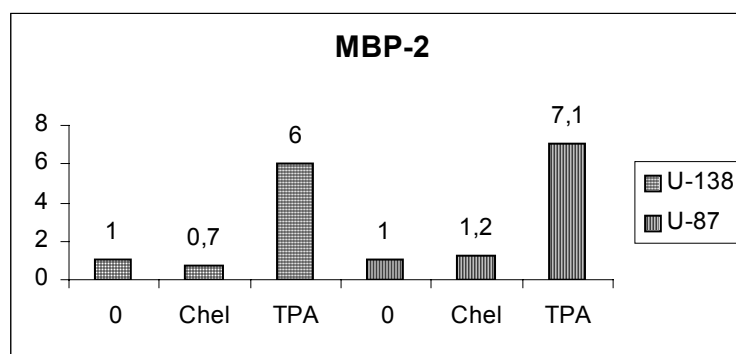


Diagramm 5: Darstellung der Signalunterschiede MBP-2. Zelllinien U-138 und U-87.

3.3.4 β_2 -adrenerger Rezeptor

Bei der Auswertung für die Expression des β_2 -adrenergen Rezeptor in LN-405-Zellen nach TPA-Behandlung zeigt sich ein Anstieg im Verlauf der Zeitreihe. Chelerythrin und PTHrP haben keinen Einfluß.

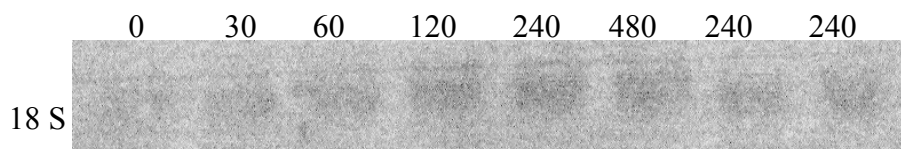


Abb. 18: Radioaktiver Northernblot - Sonde β_2 -adrenerger Rezeptor. Zelllinie LN-405. (0: keine Behandlung, 30-480: Behandlungszeiten TPA in min, 240: Behandlungszeit Chelerythrin in min, 240: Behandlungszeit PTHrP in min)

Tabelle 6: Auswertung der Signalunterschiede β_2 -adrenerger Rezeptor. Zelllinie LN-405.

LN-405		TPA	TPA	TPA	TPA	TPA	Chel	PTHrP	LW
t [min]	0	30	60	120	240	480	240	240	
Rohwerte	12084	14770	17250	19808	22037	22729	14302	14728	9710
RW-LW	2374	5060	7540	10098	12327	13019	4592	5018	0
RW-LW(G3PDH)	693	738	749	742	720	579	579	534	0
β_2 -Rez./G3PDH	3,43	6,86	10,07	13,61	17,12	22,49	7,93	9,40	
/3,43	1,0	2,0	2,9	4,0	5,0	6,6	2,3	2,7	

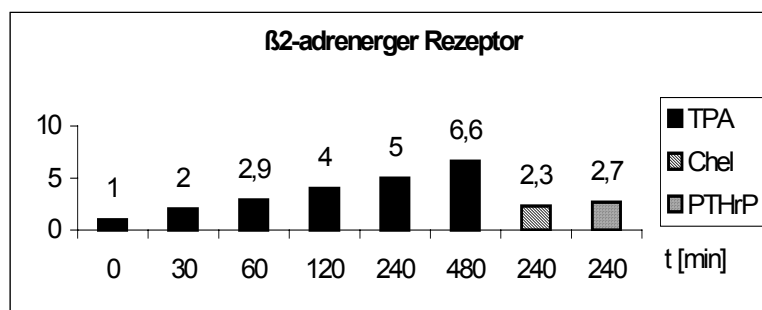


Diagramm 6: Darstellung der Signalunterschiede β_2 -adrenerger Rezeptor. Zelllinie LN-405.

Auch in einer weiteren Zelllinie (U-138) ist ein deutlicher Anstieg der Expression zu erkennen. In der gleichen Linie kann eine Verminderung der Expression nach Chelerythrinbehandlung beobachtet werden. Der Anstieg der Expression in LN-405-Zellen nach TPA-Behandlung konnte hier nicht noch einmal gezeigt werden.

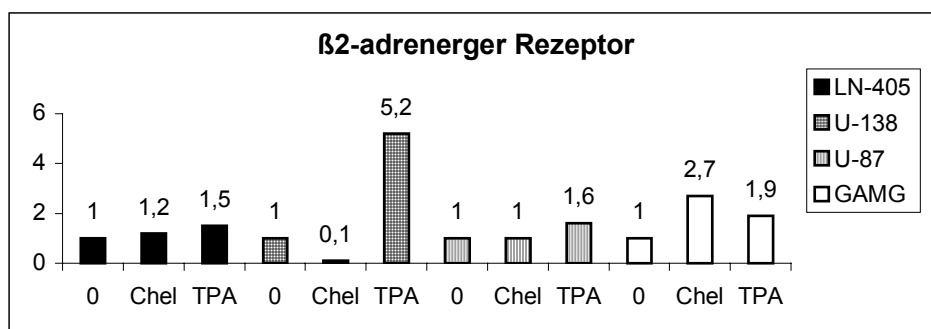


Diagramm 7: Darstellung der Signalunterschiede β_2 -adrenerger Rezeptor. Zelllinien LN-405, U-138, U-87 und GAMG.

3.3.5 M-Phase Phosphoprotein-1 (MPP-1)

Das MPP-1 zeigt einen deutlichen Anstieg der Expression in LN-405-Zellen nach TPA-Behandlung. Sie sinkt nach Chelerythrin-Behandlung ab, PTHrP hat keinen Einfluß.

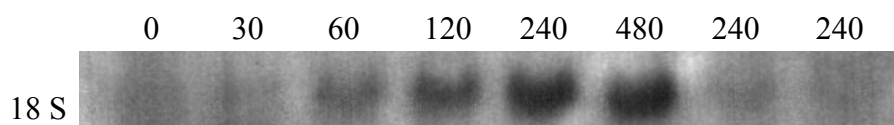


Abb. 19: Radioaktiver Northernblot - Sonde MPP-1. Zelllinie LN-405. (0: keine Behandlung, 30-480: Behandlungszeiten TPA in min, 240: Behandlungszeit Chelerythrin in min, 240: Behandlungszeit PTHrP in min)

Tabelle 7: Auswertung der Signalunterschiede MPP-1. Zelllinie LN-405.

MPP-1		TPA	TPA	TPA	TPA	TPA	Chel	PTHrP	LW
t [min]	0	30	60	120	240	480	240	240	
Rohwerte	584	563	598	625	665	671	556	569	554
RW-LW	30	9	44	71	111	117	2	15	0
RW-LW(G3PDH)	726	650	629	570	688	606	528	555	0
MPP-1/G3PDH	0,04	0,01	0,07	0,12	0,16	0,19	0,00	0,03	
/0,04	1,0	0,3	1,7	3,0	3,9	4,7	0,09	0,7	

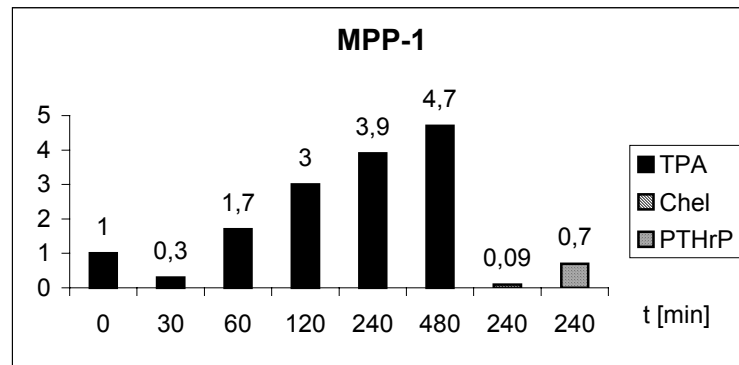


Diagramm 8: Darstellung der Signalunterschiede MPP-1. Zelllinie LN-405.

In den anderen Zelllinien konnte kein Anstieg der Expression nachgewiesen werden.

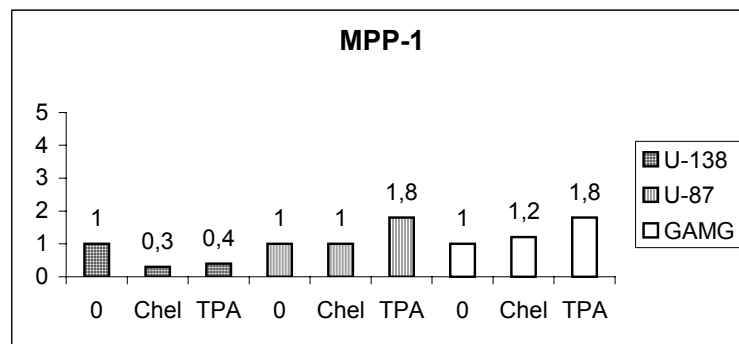


Diagramm 9: Darstellung der Signalunterschiede MPP-1. Zelllinien U-138, U-87 und GAMG.

3.3.6 Cosmid F0811

Auch die Sequenz aus dem Cosmid F0811 zeigt einen Anstieg der Expression nach TPA-Behandlung in LN-405-Zellen. Auch hier beeinflussen Chelerythrin und PTHrP die Expression nicht.

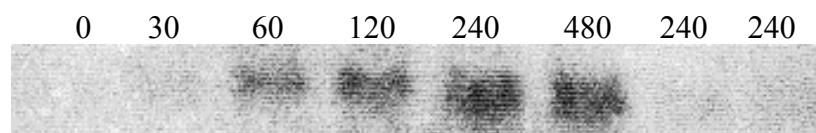


Abb. 20: Radioaktiver Northernblot - Sonde Cosmid F0811. Zelllinie LN-405. (0: keine Behandlung, 30-480: Behandlungszeiten TPA in min, 240: Behandlungszeit Chelerythrin in min, 240: Behandlungszeit PTHrP in min)

Tabelle 8: Auswertung der Signalunterschiede Cosmid F0811. Zelllinie LN-405.

LN-405		TPA	TPA	TPA	TPA	TPA	Chel	PTHrP	LW
t [min]	0	30	60	120	240	480	240	240	
Rohwerte	875	1063	1327	1400	1424	1555	996	825	746
RW-LW	129	317	581	654	678	809	250	79	0
RW-LW(G3PDH)	485	540	523	509	428	393	510	405	0
C. F0811/G3PDH	0,27	0,59	1,11	1,28	1,58	2,06	0,49	0,20	
/0,27	1,0	2,2	4,2	4,8	6,0	7,7	1,8	0,7	

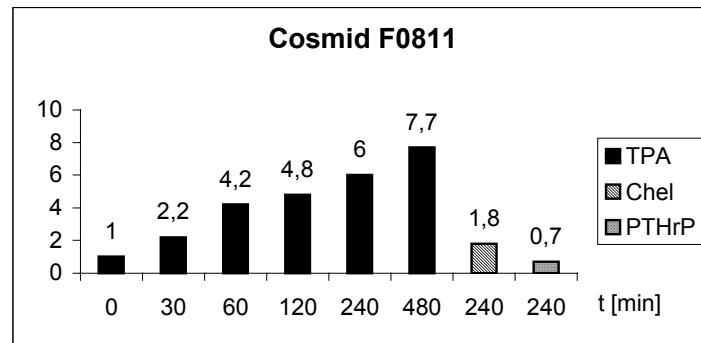


Diagramm 10: Darstellung der Signalunterschiede Cosmid F0811. Zelllinie LN-405.

In einer weiteren Zelllinie (U-87) konnte die Expression nach TPA-Behandlung gesteigert werden.

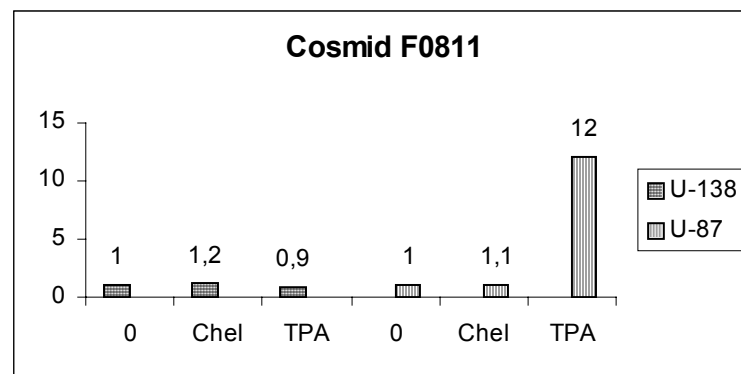


Diagramm 11: Darstellung der Signalunterschiede Cosmid F0811. Zelllinien U-138 und U-87.

3.3.7 ect2-Oncogen

In LN-405-Zellen steigt die Expression des ect2-Oncogen nach TPA-Behandlung an. Sie bleibt von Chelerythrin und PTHrP unbeeinflusst.

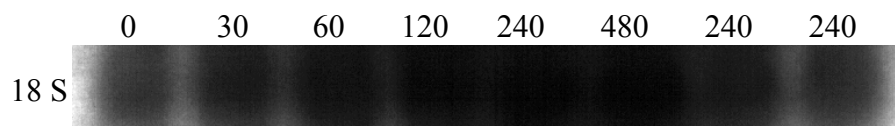


Abb. 21: Radioaktiver Northernblot - Sonde ect2-Oncogen. Zelllinie LN-405. (0: keine Behandlung, 30-480: Behandlungszeiten TPA in min, 240: Behandlungszeit Chelerythrin in min, 240: Behandlungszeit PTHrP in min)

Tabelle 9: Auswertung der Signalunterschiede ect2-Oncogen. Zelllinie LN-405.

LN-405		TPA	TPA	TPA	TPA	TPA	Chel	PTHrP	LW
t [min]	0	30	60	120	240	480	240	240	
Rohwerte	1207	1479	1750	1975	2145	2171	1877	1535	717
RW-LW	490	762	1033	1258	1428	1454	1160	818	0
RW-LW(G3PDH)	101	118	141	151	101	88	89	81	0
ect2/G3PDH	4,85	6,46	7,33	8,33	14,14	16,52	13,03	10,10	
/4,85	1,0	1,3	1,5	1,7	2,9	3,4	2,7	2,1	

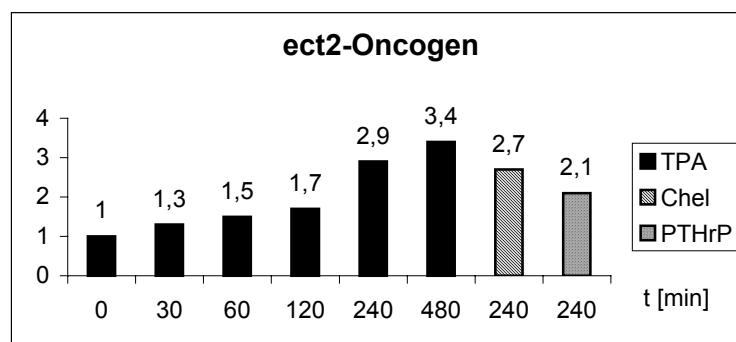


Diagramm 12: Darstellung der Signalunterschiede ect2-Oncogen. Zelllinie LN-405.

In einer weiteren Zelllinie (GAMG) steigt die Expression nach TPA-Behandlung ebenso an. In dieser Linie hat allerdings auch Chelerythrin einen geringen steigernden Effekt.

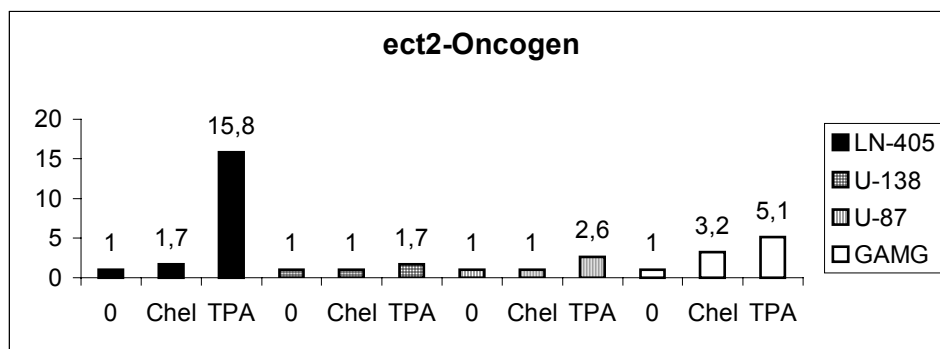


Diagramm 13: Darstellung Signalunterschiede ect2-Oncogen. Zelllinien LN-405, U-138, U-87 und GAMG.

3.3.8 Methionin-Adenosyltransferase alpha

Auf die Methionin-Adenosyltransferase alpha hat TPA in LN-405-Zellen einen expressionssteigernden Einfluß. Chelerythrin oder PTHrP haben keinen über dem Grenzwert liegenden expressionssteigernden Effekt.

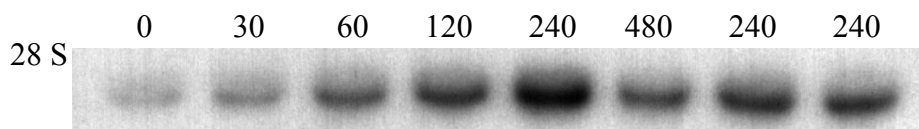


Abb. 22: Radioaktiver Northernblot - Sonde Methionine-Adenosyltransferase. Zelllinie LN-405. (0: keine Behandlung, 30-480: Behandlungszeiten TPA in min, 240: Behandlungszeit Chelerythrin in min, 240: Behandlungszeit PTHrP in min)

Tabelle 10: Auswertung der Signalunterschiede Methionine-Adenosyltransferase. Zelllinie LN-405.

LN-405		TPA	TPA	TPA	TPA	TPA	Chel	PTHrP	LW
t [min]	0	30	60	120	240	480	240	240	
Rohwerte	391	453	528	645	703	540	601	574	293
RW-LW	98	160	235	352	410	247	308	281	0
RW-LW(G3PDH)	466	633	675	677	667	656	714	587	0
Adenosylt./G3PDH	0,17	0,25	0,35	0,52	0,61	0,38	0,43	0,48	
/0,17	1,0	1,5	2,0	3,1	3,6	2,2	2,5	2,8	

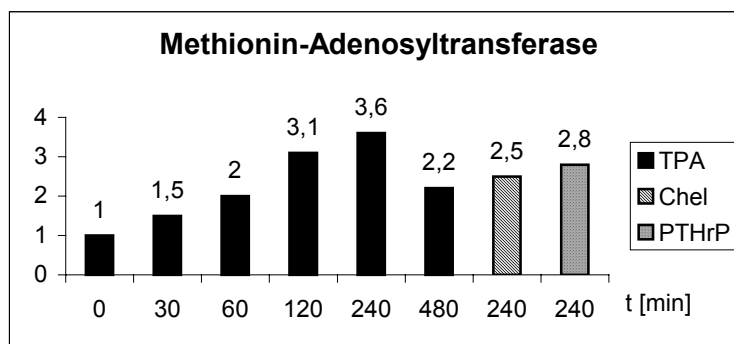


Diagramm 14: Darstellung der Signalunterschiede Methionine-Adenosyltransferase. Zelllinie LN-405.

Versuche an anderen Zelllinien konnten nicht durchgeführt werden.

3.3.9 PAC-Klon

Der Klon PAC RP4-75E10 wird von einer Behandlung in LN-405-Zellen mit TPA, PTHrP oder Chelerythrin nicht über dem Grenzwert liegend expressionssteigernd beeinflusst.

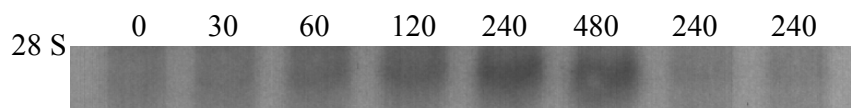


Abb. 23: Radioaktiver Northernblot - Sonde PAC RP4-75E10. Zelllinie LN-405. (0: keine Behandlung, 30-480: Behandlungszeiten TPA in min, 240: Behandlungszeit Chelerythrin in min, 240: Behandlungszeit PTHrP in min)

Tabelle 11: Auswertung der Signalunterschiede PAC RP4-75E10. Zelllinie LN-405.

PAC		TPA	TPA	TPA	TPA	TPA	Chel	PTHrP	LW
240 min	0	30	60	120	240	480	240	240	
Rohwerte	266	276	309	344	389	366	258	248	181
RW-LW	85	95	128	163	208	185	77	67	0
RW-LW(G3PDH)	101	118	141	151	101	88	89	81	0
PAC/G3PDH	0,84	0,81	0,91	1,08	2,06	2,10	0,87	0,83	
/0,84	1,0	1,0	1,1	1,3	2,4	2,5	1,0	1,0	

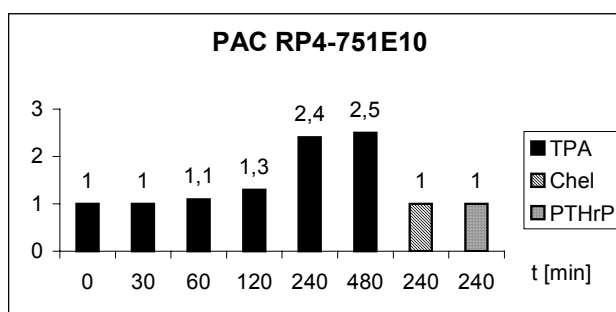


Diagramm 15: Darstellung der Signalunterschiede PAC RP4-75E10. Zelllinie LN-405.

Für diesen Klon konnten keine Versuche an anderen Zelllinien durchgeführt werden.

3.3.10 ERM-Gen

Das ERM-Gen reagiert auf TPA-Behandlung in LN-405-Zellen mit einer Steigerung seiner Expression. Chelerythrin und PTHrP haben keinen Einfluß.

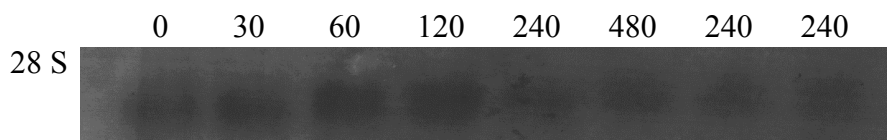


Abb. 24: Radioaktiver Northernblot - Sonde ERM-Gen. Zelllinie LN-405. (0: keine Behandlung, 30-480: Behandlungszeiten TPA in min, 240: Behandlungszeit Chelerythrin in min, 240: Behandlungszeit PTHrP in min)

Tabelle 12: Auswertung der Signalunterschiede Erm-Gen. Zelllinie LN-405.

LN-405		TPA	TPA	TPA	TPA	TPA	Chel	PTHrP	LW
t [min]	0	30	60	120	240	480	240	240	
Rohwerte	786	820	845	869	848	848	846	831	744
RW-LW	42	76	101	125	104	104	102	87	0
RW-LW(G3PDH)	213	183	166	215	98	99	170	209	0
ERM-Gen/G3PDH	0,20	0,42	0,61	0,58	1,06	1,05	0,60	0,42	
/0,2	1,0	2,1	3,1	3,0	5,4	5,3	3,0	2,1	

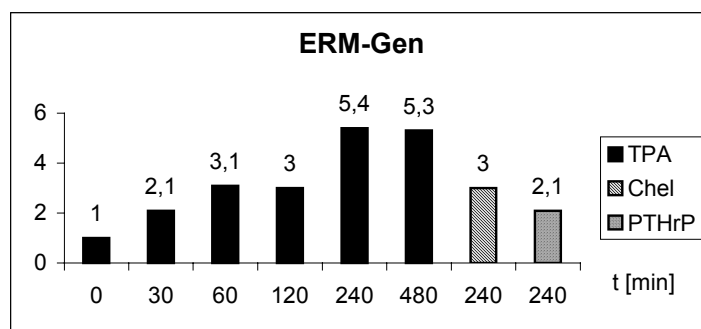


Diagramm 16: Darstellung der Signalunterschiede ERM-Gen. Zelllinie LN-405.

In einer weiteren Zelllinie (U-138) konnte diese Expressionssteigerung nachgewiesen werden.

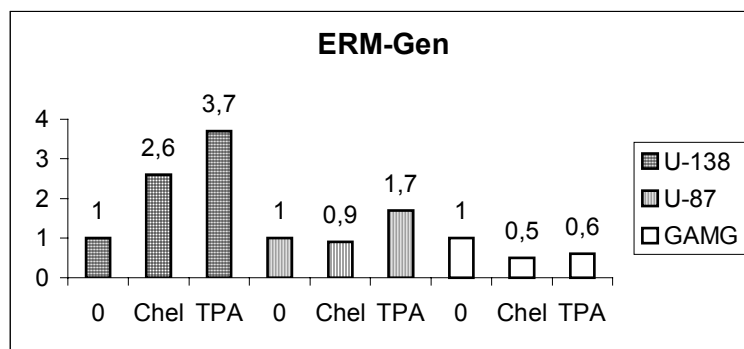


Diagramm 17: Darstellung der Signalunterschiede ERM-Gen. Zelllinien U-138, U-87 und GAMG.

3.3.11 PVT

Auf die Expression von PVT in LN-405-Zellen haben weder TPA, Chelerythrin noch PTHrP Einfluß. Der nach optischer Ansicht des Northernblots bestehende Eindruck, daß die Expression bis zum 120-Minutenwert deutlich ansteigen würde, wird durch die Auswertung im Vergleich mit der G3PDH -Sonde nicht bestätigt.

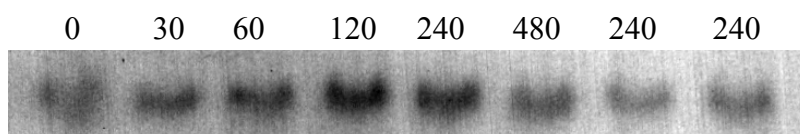


Abb. 25: Radioaktiver Northernblot - Sonde PVT. Zelllinie LN-405. (0: keine Behandlung, 30-480: Behandlungszeiten TPA in min, 240: Behandlungszeit Chelerythrin in min, 240: Behandlungszeit PTHrP in min)

Tabelle 13: Auswertung der Signalunterschiede PVT. Zelllinie LN-405.

LN-405		TPA	TPA	TPA	TPA	TPA	Chel	PTHrP	LW
t [min]	0	30	60	120	240	480	240	240	
Rohwerte	391	389	399	403	386	358	330	339	299
RW-LW	92	90	100	104	87	59	31	40	0
RW-LW(G3PDH)	726	650	629	570	688	606	528	555	0
PVT/G3PDH	0,13	0,14	0,16	0,18	0,13	0,10	0,06	0,07	
/0,13	1,0	1,1	1,3	1,4	1,0	0,8	0,5	0,6	

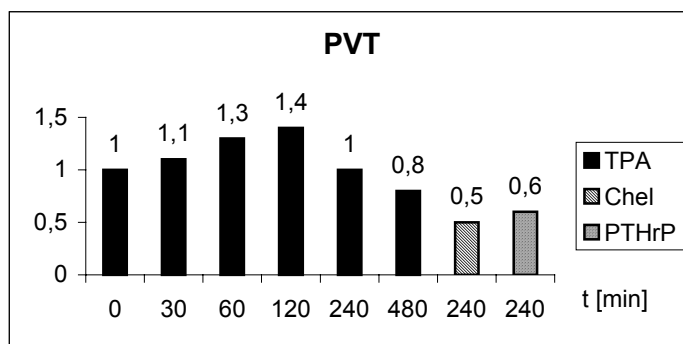


Diagramm 18: Darstellung der Signalunterschiede PVT. Zelllinie LN-405.

Auch die Expression von PVT in den anderen Zelllinien wird nicht über den Grenzwert hinaus beeinflußt.

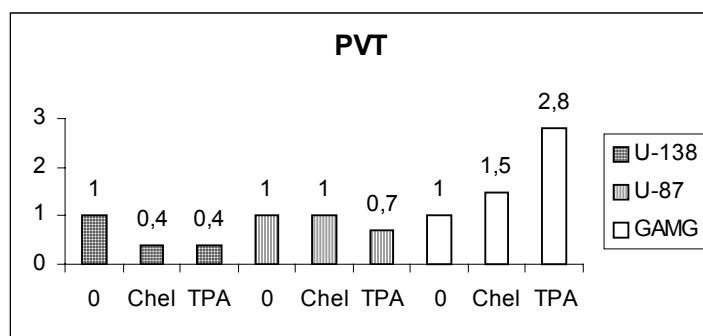


Diagramm 19: Darstellung der Signalunterschiede PVT. Zelllinien U-138, U-87 und GAMG.

3.3.12 Metallopanstimulin

Auf die Expression von Metallopanstimulin in LN-405-Zellen haben TPA, Chelerythrin und PTHrP keinen Einfluß.

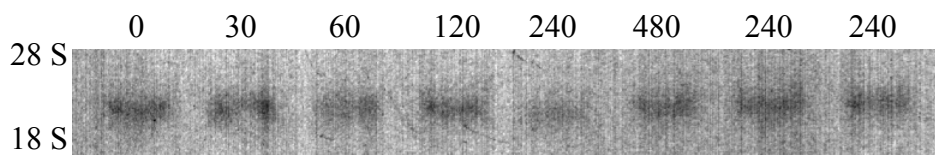
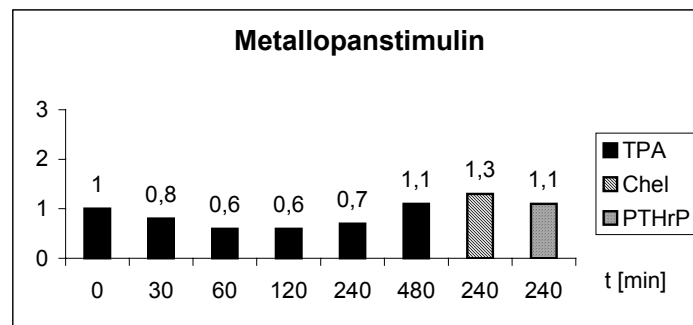


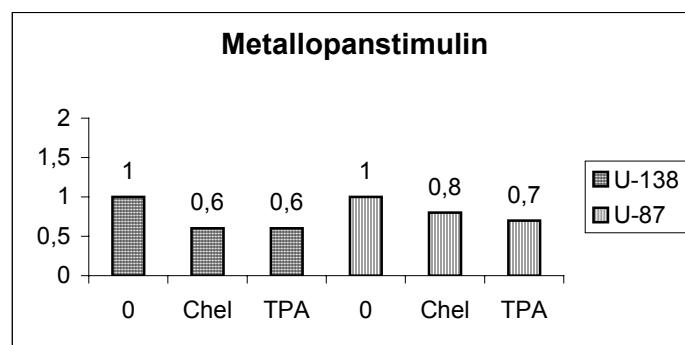
Abb. 26: Radioaktiver Northernblot - Sonde Metallopanstimulin. Zelllinie LN-405. (0: keine Behandlung, 30-480: Behandlungszeiten TPA in min, 240: Behandlungszeit Chelerythrin in min, 240: Behandlungszeit PTHrP in min)

Tabelle 14: Auswertung der Signalunterschiede Metallopanstimulin. Zelllinie LN-405.

LN-405		TPA	TPA	TPA	TPA	TPA	Chel	PTHrP	LW
t [min]	0	30	60	120	240	480	240	240	
Rohwerte	191	188	185	188	181	189	196	188	160
RW-LW	31	28	25	28	21	29	36	28	0
RW-LW(G3PDH)	101	118	141	151	101	88	89	81	0
Metallop./G3PDH	0,31	0,24	0,18	0,19	0,21	0,33	0,40	0,35	
/0,31	1,0	0,8	0,6	0,6	0,7	1,1	1,3	1,1	

**Diagramm 20: Darstellung der Signalunterschiede Metallopanstimulin. Zelllinie LN-405.**

Auch die Versuche an zwei anderen Zelllinien (U-138, U-87) zeigen kein verändertes Expressionsmuster von Metallopanstimulin.

**Diagramm 21: Darstellung der Signalunterschiede Metallopanstimulin. Zelllinien U-138 und U-87.**

3.3.13 Ornithin-Decarboxylase Antizym 2

Auf die Expression des Ornithin-Decarboxylase Antizym 2 in LN-405-Zellen hat die Behandlung mit TPA einen expressionssteigernden Einfluß, Chelerythrin oder PTHrP haben keinen Einfluß.

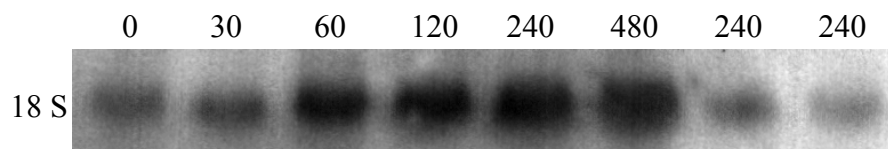


Abb. 27: Radioaktiver Northernblot - Sonde Ornithin-Decarboxylase Antizym 2. Zelllinie LN-405. (0: keine Behandlung, 30-480: Behandlungszeiten TPA in min, 240: Behandlungszeit Chelerythrin in min, 240: Behandlungszeit PTHrP in min)

Tabelle 15: Auswertung der Signalunterschiede Ornithin-Decarboxylase Antizym 2. Zelllinie LN-405.

LN-405		TPA	TPA	TPA	TPA	TPA	Chel	PTHrP	LW
t [min]	0	30	60	120	240	480	240	240	
Rohwerte	1259	1134	1529	1585	1825	1874	1079	941	637
RW-LW	622	497	892	948	1188	1237	442	304	0
RW-LW(G3PDH)	740	605	586	535	423	431	553	447	0
Antizym/G3PDH	0,84	0,82	1,52	1,77	2,81	2,87	0,80	0,68	
/0,84	1,0	1,0	1,8	2,1	3,3	3,4	0,9	0,8	

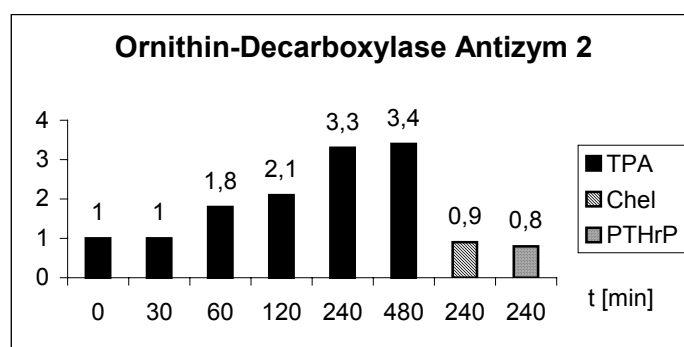


Diagramm 22: Darstellung der Signalunterschiede Ornithin-Decarboxylase Antizym 2. Zelllinie LN-405.

Es zeigt sich ebenfalls eine Steigerung der Expression nach TPA-Behandlung in der Linie U-138.

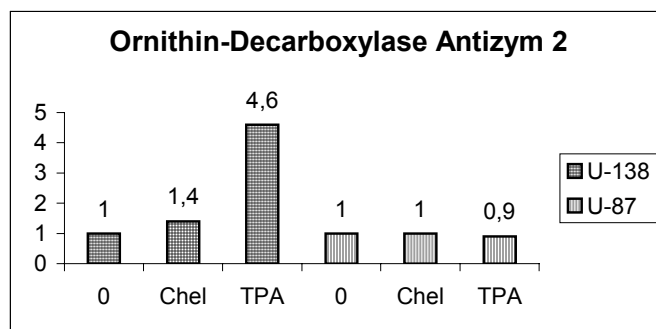


Diagramm 23: Darstellung der Signalunterschiede Ornithin-Decarboxylase Antizym 2. Zelllinien U-138 und U-87.

3.3.14 Interferon- γ Rezeptor 2

In LN-405-Zellen ändert sich die Expression des Interferon- γ Rezeptor 2 nach TPA-Behandlung. Chelerythrin- oder PTHrP-Behandlung haben keinen Einfluß.

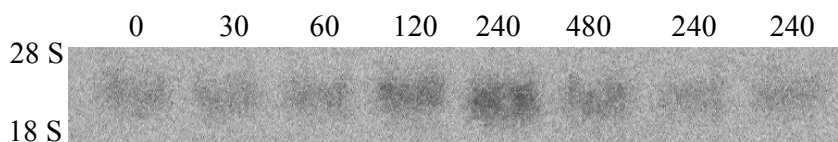


Abb. 28: Radioaktiver Northernblot - Sonde Interferon- γ Rezeptor 2. Zelllinie LN-405. (0: keine Behandlung, 30-480: Behandlungszeiten TPA in min, 240: Behandlungszeit Chelerythrin in min, 240: Behandlungszeit PTHrP in min)

Tabelle 16: Auswertung der Signalunterschiede Interferon- γ Rezeptor 2. Zelllinie LN-405.

Interferon- γ Rez.		TPA	TPA	TPA	TPA	TPA	Chel	PTHrP	LW
t [min]	0	30	60	120	240	480	240	240	
Rohwerte	14967	14357	14707	19819	25782	18129	14100	14402	10598
RW-LW	4369	3759	4109	9221	15184	7531	3502	3804	0
RW-LW(G3PDH)	693	748	685	754	620	663	589	524	0
Interf./G3PDH	6,4	5,03	6,00	14,10	24,49	11,36	5,95	7,26	
/6,3	1,0	0,8	0,9	2,2	3,9	1,8	0,9	1,1	

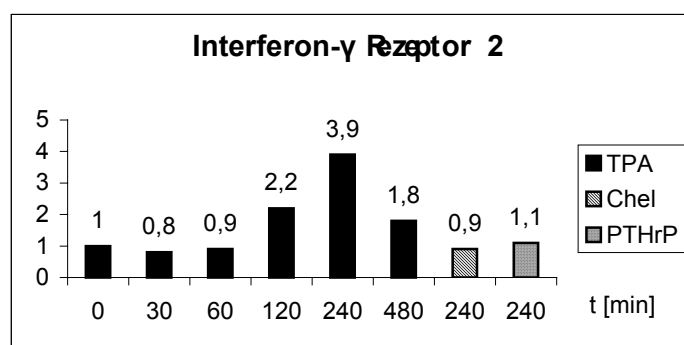


Diagramm 24: Darstellung der Signalunterschiede Interferon- γ Rezeptor 2. Zelllinie LN-405.

Auch in zwei weiteren Zelllinien (U-138, U-87) kommt es zu einer Steigerung der Expression von Interferon- γ Rezeptor 2 nach TPA-Behandlung.

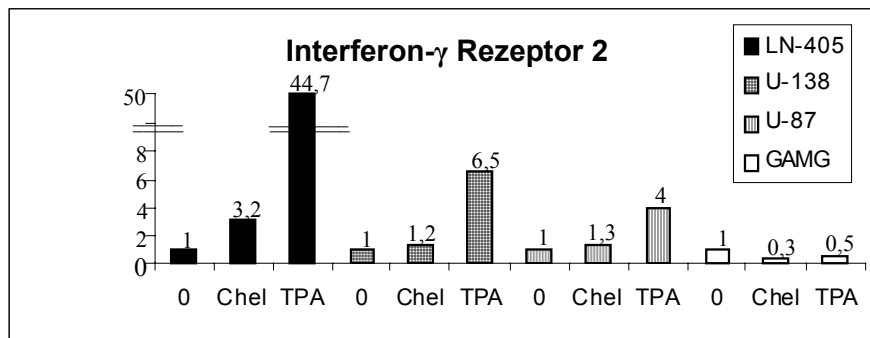


Diagramm 25: Darstellung der Signalunterschiede Interferon- γ Rezeptor 2. Zelllinien LN-405, U-138, U-87 und GAMG.

3.3.15 Zusammenfassung der Ergebnisse der Northern-Blot-Kontrollen

Einen zusammenfassenden Überblick über die Ergebnisse der Northernblot-Kontrollen gibt die nachstehende Tabelle.

Tabelle 17: Zusammenfassung der Ergebnisse der Northernblot-Kontrolle
 (↑: Expressionssteigerung, ↓: verminderte Expression, —: keine Expressionsänderung, Ø: Versuch nicht durchgeführt, (): grenzwertige Veränderung).

	LN-405			U-138		U-87		GAMG	
Gen	TPA	Chel	PTHrP	TPA	Chel	TPA	Chel	TPA	Chel
IL-8	↑	—	—	—	—	↑	—	↑	(↑)
Calpain	↑	—	↓	—	↓	↑	—	(↑)	—
MBP-2	↑	↓	—	↑	—	↑	—	Ø	Ø
β ₂ -adrenerger Rez.	↑	—	—	↑	↓	—	—	—	—
MPP-1	↑	↓	—	—	↓	—	—	—	—
Cosmid F0811	↑	—	—	—	—	↑	—	Ø	Ø
ect2-Oncogen	↑	—	—	—	—	(↑)	—	↑	(↑)
Adenosyltransferase	↑	—	—	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
PAC Klon	—	—	—	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
ERM Gen	↑	(↑)	—	↑	—	—	—	—	—
PVT	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Metallopanstimulin	—	—	—	—	—	—	—	Ø	Ø
ODC-Antizym 2	↑	—	—	↑	—	—	—	Ø	Ø
Interferon-γ Rez. 2	↑	—	—	↑	—	↑	—	—	↓

Die Northernblot-Kontrollen zeigen, daß von den 14 untersuchten Genen elf nach TPA-Behandlung in LN-405-Zellen tatsächlich differentiell exprimiert werden. Von diesen werden neun in mindestens einer weiteren Astrozytomzelllinie ebenfalls differentiell exprimiert. Auf die drei anderen Gene scheint TPA, wie auch Chelerythrin und PTHrP, keinen Effekt auszuüben. Für PTHrP konnte nur bei einem Gen ein die Expression vermindender Effekt gezeigt werden. Chelerythrin hat für vier Gene in mindestens einer Zelllinie ebenfalls eine die Expression vermindende Wirkung. Allerdings zeigt sich ein gegenteiliger Effekt für drei andere Gene, wobei die Werte der Expression eng am gegebenen Grenzfaktor drei liegen.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der angewandten Methoden

4.1.1 Generierung des Ausgangsmaterials für den PCR-Select-Assay

Die DNA einer Zelle enthält die Informationen für die Biosynthese der Proteine. Damit diese Informationen für die Synthese neuer Proteine genutzt werden können, müssen sie in eine Form umgeschrieben werden, die aus dem Zellkern an den Ort der Biosynthese, den Ribosomen, im Cytosol transportiert werden kann. Diesen Vorgang bezeichnet man als Transkription, die Transportform ist die Messenger-RNA (mRNA). Je nachdem welche Proteine zu synthetisieren sind, werden unterschiedliche DNA-Abschnitte transkribiert. Die Biosynthese eines spezifischen Genproduktes, hier der mRNA, bezeichnet man als Genexpression. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob es mit der „Suppression subtractive hybridization“-Methode möglich ist, Einflüsse der Proteinkinase C auf das Genexpressionsmuster von Astrozytomzellen zu finden. Als Ausgangsmaterial für die „Suppression subtractive hybridization“ dient die mRNA unterschiedlich behandelter Zellen.

Im folgenden werden die Schritte:

1. Behandlung der Zellen
2. RNA-Isolation
3. mRNA-Isolation

im einzelnen diskutiert.

4.1.1.1 Behandlung der Zellen

Um die PKC-Aktivität zu erhöhen, wurde der Phorbol-Ester TPA in einer Konzentration von 10 nM (=6 ng/ml) verwendet. Castagna et al. (1982) konnten zeigen, daß TPA, welches in seinem Molekül eine diacylglycerol-ähnliche Struktur besitzt, die PKC anstelle von DAG direkt aktivieren kann. Dabei reichen schon sehr geringe Konzentrationen im nanomolaren Bereich aus, um eine signifikante PKC-Aktivitätserhöhung zu erreichen (Castagna et al. 1982).

Bei einer optimalen Konzentration (5-10 ng/ml) wird eine 2-5fache Steigerung der DNA-Synthese erreicht (Pollack et al. 1990).

Nach der Aktivierung der PKC durch TPA folgt die Down-Regulation der Kinase. Die Effektivität der Down-Regulation hängt dabei von der TPA-Konzentration und der Einwirkungsdauer ab (Rodriguez-Pena und Rozengurt 1984, Ballester und Rosen 1985). Dabei kommt es zunächst zur Translokation des cytosolischen Anteils des Enzyms, der z.B. in Astrozyten den Hauptteil von etwa 90% ausmacht (Neary et al. 1988), an die Membran (Kraft und Anderson 1983, Rodriguez-Pena und

Rozengurt 1984). Die daraufhin erfolgende proteolytische Spaltung wird durch die zelluläre membran-ständige Protease Calpain katalysiert (Kishimoto et al. 1989).

Dabei entsteht ein Fragment, das die Ca^{2+} -, Phospholipid- und Phorbol-Ester/Diacylglycerol-Bindungsstelle enthält. Möglicherweise ist die angereicherte, regulatorische Domäne biologisch aktiv (Fournier und Murray 1987). Das Amino-Ende dieses Fragments enthält eine Sequenz, die für DNA-bindende Proteine charakteristisch ist (Parker et al. 1986) und so möglicherweise direkt die Transkription von spezifischen Proteinen reguliert.

Bei der in dieser Arbeit eingesetzten TPA-Konzentration und der maximalen Einwirkungsdauer von acht Stunden ist die PKC-Aktivität erhöht.

Um die Aktivität der PKC zu inhibieren, wurde Chelerythrin verwendet. Chelerythrin ist ein Benzophenanthridin-Alkaloid, welches im Gegensatz zu anderen Inhibitoren der PKC, wie Staurosporin oder Isoquinolinesulfonamid (z.B.: H-7), die PKC selektiv hemmt. Dabei greift Chelerythrin an der katalytischen Domäne der PKC an und erreicht die halb-maximale Inhibition der Kinase bei einer Konzentration von $0,7 \mu\text{M}$ (Herbert et al. 1990), so daß bei der hier eingesetzten Endkonzentration von $2 \mu\text{M}$ eine nahezu vollständige Inhibition erreicht wird.

Die Zellen als Ausgangsmaterial für den PCR-Select-Assay wurden jeweils vier Stunden behandelt.

4.1.1.2 RNA-Isolation

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach der 1987 beschriebenen Methode von Chromzynski und Sacchi, die gut etabliert ist und vielfach eingesetzt wird.

Dabei werden die Zellen durch das eingesetzte Guanidinium-Thiocyanat und Chlorid denaturiert. So werden auch diejenigen Ribonukleasen inhibiert, die zur Degradierung der RNA führen würden. Die Separation von RNA, DNA und Proteinen erfolgt durch Phasentrennung. Die RNA kann dann isoliert, mit Alkohol gefällt und für die weitere Verwendung in Wasser aufgenommen werden.

Die RNA ist gegenüber Verunreinigungen mit Ribonukleasen sehr anfällig. Nach der Isolation muß daher überprüft werden, ob die RNA intakt ist, wozu man die Gelelektrophorese verwendet. Die RNA wandert aufgrund ihrer negativen Ladung in einem denaturierendem Agarosegel zur Anode. Dabei verhindert das eingesetzte Formaldehyd die Sekundärstrukturbildung, so daß sich die RNA anhand der Molekülgröße in Fraktionen (28S, 18S) auftrennt. Durch Einfärben der RNA mit Ethidiumbromid können die Fraktionen unter UV-Licht sichtbar gemacht und die Isolation beurteilt werden.

4.1.1.3 mRNA-Isolation

Für die mRNA-Isolation macht man sich zunutze, daß von der Poly-A-Polymerase an das primäre mRNA-Transkript 100-200 Adenosylsäurereste (Poly-A-Schwanz) an das 3'-Ende angefügt werden. Läßt man die gesamte zelluläre RNA durch eine Säule mit Oligo-dT-Cellulose laufen, werden die

Moleküle mit Poly-A-Schwänzen durch komplementäre Basenpaarung zwischen T- und A-Resten an der Cellulose gebunden. Danach wird die gebundene mRNA wieder freigesetzt, gefällt und für die weitere Verwendung in Wasser aufgenommen.

Um zu überprüfen, ob auch die mRNA intakt ist, wurde neben der Gelelektrophorese eine Amplifikation von Aldolase durchgeführt. Aldolase gehört zu den Housekeeping-Genen, die Funktionen, die von allen Zellarten gebraucht werden, erfüllen und somit in allen Zellen exprimiert werden. Dazu wurde zunächst die mRNA durch Reverse-Transkription in cDNA umgeschrieben. Dann erfolgte eine PCR mit aldolase-spezifischen Primern.

Die Proben wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt und mit Ethidiumbromid für die UV-Kontrolle eingefärbt. Die Höhen der Banden konnten anhand des Markervergleichs mit der erwarteten Höhe für Aldolase verglichen werden.

Mit den drei Schritten (Behandlung der Zellen, RNA- und mRNA-Isolation) war das Ausgangsmaterial (mRNA) für die SSH vorbereitet und dessen Integrität durch die Kontrollen (Elektrophorese, Aldolase-Amplifikation) sichergestellt.

4.1.2 PCR-Select-Assay

Das Prinzip der SSH-Methode und deren einzelnen Schritte wurden im Kapitel 2.2.4 „Material und Methoden“ bereits beschrieben.

Folgende Schritte der SSH wurden innerhalb des Ablaufes kontrolliert: RsaI-Verdau, Adaptorligation, PCR-Amplifikation. Die Überprüfung der einzelnen Schritte erfolgte durch Auftrag der Proben auf einem Agarosegel und elektrophoretischer Auftrennung. Unter UV-Licht konnten die mit Ethidiumbromid eingefärbten Proben beurteilt und mit den jeweiligen Vorgaben verglichen werden. Zur Kontrolle der Adaptorligation mußte vor Auftrag auf das Agarosegel eine PCR durchgeführt werden. Es wird verglichen, ob die Amplifikation von G3PDH in den adaptorligierten Proben genauso effizient abläuft, wie in den Kontrollen. Die Adaptern dienen den PCR-Primern 1 oder 2, zu denen sie komplementär sind, als Ansatzstelle. G3PDH wird als Housekeeping-Gen in allen Zellen exprimiert, ist also auch in den zu vergleichenden Proben vor der Subtraktion als cDNA vorhanden.

4.1.3 Überprüfung und Auswertung der Ergebnisse der SSH

Die SSH-Methode liefert als Ergebnis zunächst nur einen Ansatz mit vermeintlich differentiell exprimierten cDNA-Abschnitten. Um diese cDNAs weiter untersuchen zu können, müssen sie isoliert in geeigneten Mengen vorliegen, was mit dem Klonieren erreicht wird.

4.1.3.1 Klonierung der differentiell exprimierten cDNAs

Das Vervielfältigen von DNA-Abschnitten durch Integration in einen Plasmidvektor und anschließende Transformation in Bakterien ist ein gut etabliertes und vielfach eingesetztes Verfahren.

Plasmide sind kleine zirkuläre doppelsträngige DNA-Moleküle, die natürlicherweise in Bakterien vorkommen. Der von uns eingesetzte pCR[®] 2.1 Vektor enthält u.a. zwei EcoRI-Schnittstellen und Primer-Abschnitte, die für die Sequenzierung gebraucht werden sowie die lacZ'-Sequenz und ein Gen, das Bakterien resistent gegen Ampicillin macht.

Zunächst wurden die durch die SSH-Methode gewonnenen cDNA-Abschnitte mit Hilfe einer Ligase in Plasmide eingefügt. Dabei ist die Effizienz bei einem Vektor-Insert-Verhältnis von 1:1 am größten. Um Ungenauigkeiten auszugleichen, die bei der Messung der DNA-Konzentration entstehen, wurde ein zweiter Ansatz mit einem Vektor-Insert-Verhältnis von 1:3 durchgeführt. Dann konnten die Plasmide in Bakterienzellen eingeführt werden (Transformation). Durch Zugabe von Ampicillin wachsen auf einer LB-Agarplatte diejenigen Bakterien zu Kolonien heran, die durch das entsprechende Gen auf dem eingefügten Plasmid resistent gegen das Antibiotikum sind. Um Bakterienkolonien, die Plasmide mit den eingefügten cDNA-Abschnitten enthalten, von solchen zu unterscheiden, bei denen das Einfügen der Abschnitte nicht funktioniert hat, macht man sich die Blau-Weiß-Selektion zunutze. Der Vektor enthält die für das α -Peptid codierende DNA-Region (lacZ') der β -Galactosidase. Dieses Peptid ist enzymatisch inaktiv, kann aber mit einem ebenfalls enzymatisch inaktivem Peptid (codiert als lacZ-Gen mit Deletion M15 im aminoterminalen Bereich) des Wirtsbakteriums zu einer biologisch aktiven Form der β -Galactosidase reassoziieren (α -Komplementation). Die β -Galactosidase setzt einen Farbstoff (IPTG = Isopropyl- β -D-Thiogalactosid) um, was zu einer blauen Farbe der Bakterienkolonien führt. Wird nun die für das α -Peptid codierende DNA-Region des Klonierungsvektors durch Einbau von Fremd-DNA unterbrochen, geht die Fähigkeit zur Komplementation und damit zur Bildung von enzymatisch aktiver β -Galactosidase verloren. Die Bakterienkolonien, welche die gesuchten cDNA-Abschnitte enthalten, erscheinen daher weiß und können selektiert werden.

In dieser Arbeit wurden auf diese Weise insgesamt 48 Klone gepickt. Dabei ist natürlich nicht auszuschließen, daß in weiteren, nicht gepickten Klonen andere cDNA-Abschnitte enthalten sind, die so der weiteren Untersuchung entzogen werden. Allerdings sind die weiteren Analysen so aufwendig, daß eine Beschränkung der Anzahl von zu untersuchenden Gen-Abschnitten notwendig war.

Vor der Isolation der Plasmide von den Bakterien (Minipräparation) wurden die vereinzelter Bakterien-Kolonien noch einmal vermehrt, um die Ausbeute zu erhöhen. Zur Minipräparation wird

das unterschiedliche Verhalten von chromosomaler und Plasmid-DNA im pH-Bereich von 12-12,5 ausgenutzt. Bei diesen pH-Werten wird bakterielle chromosomale DNA selektiv denaturiert, während kovalent geschlossene, zirkuläre DNA-Ringe intakt bleiben. Die chromosomale DNA renaturiert nach Neutralisierung und bildet einen unlöslichen Klumpen, der durch Zentrifugation entfernt werden kann. Die Plasmid-DNA konnte dann in Alkohol aufgenommen, gefällt und in Wasser aufgenommen werden.

Die einzelnen Plasmid-Proben wurden daraufhin untersucht, ob sie tatsächlich Inserts enthalten. Dazu wurde ein Teil der Plasmid-Suspensionen mit EcoR I verdaut. EcoR I ist ein Enzym, das die im Plasmidvektor spezifischen, am Rand der Inserts liegenden Schnittstellen spaltet. Durch Gelelektrophorese in einem Agarosegel und nach Anfärben mit Ethidiumbromid bilden sich dann die Inserts gemäß ihrer Größe unter UV-Licht ab. Dabei müssen die Sequenzen eines bestimmten Gens nicht dieselbe Höhe haben, da sie ja aus unterschiedlichen Kolonien stammen und damit differierende cDNA-Abschnitte eines Gens einkloniert worden sein können. (Siehe Ergebnisse, Abb. 8 bis Abb. 11).

Nach der Klonierung lagen die einzelnen cDNA-Abschnitte, integriert in Plasmidvektoren, in ausreichender Menge vor, um die weiteren Untersuchungen, d.h. Sequenzierung und Northernblot-Hybridisierung durchzuführen.

4.1.3.2 Sequenzierung

Die verwendete Sequenzierungsmethode geht auf das Sanger-Verfahren zurück. Die Plasmide mit den eingefügten DNA-Abschnitten können dabei direkt verwendet werden.

In einem PCR-Zyklus werden die Inserts, ausgehend von der Primer-Sequenz, durch die Thermo-Sequenase (DNA-Polymerase) neu synthetisiert. Dabei ist der Primer mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert. Es wird für jedes Nukleosid-Triphosphat (A, C, G, T) ein Ansatz hergestellt. Neben den basen-spezifischen dNTPs (Desoxy-Nukleosid-Triphosphate) wird in den korrespondierenden DNA-Strang ein ddNTP (Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat) eingebaut. Der Einbau eines Didesoxy-Nukleotids in den wachsenden DNA-Strang führt zum Kettenabbruch, da die für die Kettenverlängerung benötigte 3'-Hydroxyl-Gruppe im Didesoxy-Nukleotid fehlt. Daher wird die Polymerisierungsreaktion in jedem Ansatz selektiv bei A, C, G oder T beendet. Durch ein geeignetes Verhältnis von ddNTPs zu dNTPs entsteht eine Population von teilweise aufsynthetisierten DNA-Molekülen, in der jede mögliche Länge (Abbruch nach dem entsprechenden Nukleotid) vorhanden ist.

Die in allen vier Reaktionsansätzen erhaltenden DNA-Fragmente werden dann hitzedenaturiert und auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel in vier nebeneinanderliegenden Spuren elektrophoretisch aufgetrennt. Die Fragmente wandern im Gel entsprechend ihrer Größe, kleine

Fragmente schneller als die größeren, zur Anode. Auf diesem Weg laufen sie an einem Laser vorbei, der die fluoreszenz-markierten Fragmente zum Leuchten bringt. Dieses Signal wird in einem Detektor aufgenommen. Im Computer werden die Signale aller vier Banden zu einer vollständigen Sequenz aufgearbeitet.

Von den 48 gepickten, einklonierten DNA-Abschnitten konnten durch dieses Verfahren 45 sequenziert werden, dieses deckt sich mit den Ergebnissen des EcoRI-Verdaus. Dort konnten in den drei betreffenden Plasmiden ebenfalls keine Inserts gefunden werden. Möglicherweise hat in den zugehörigen Klonen keine Transformation stattgefunden und die zum Wachstum nötige Ampicillin-Resistenz ist durch bakterieneigene Resistenz möglich geworden.

Die gefundenen Sequenzen wurden dann über das BLAST-Search Programm des „National Center for Biotechnology Information“ ausgewertet. Dabei gelang eine Zuordnung von insgesamt 37 Sequenzen.

Acht Sequenzen konnten nicht zugeordnet werden. Bei diesen Sequenzen war der E-value, bei gleichzeitig schlechten Übereinstimmungswerten, immer schlechter als e^{-11} . Ein Grund dafür könnte sein, daß diese Sequenzen zu Genen gehören, die bisher nicht beschrieben wurden. Möglicherweise ist dort aber auch die PCR der Sequenzierung fehlerhaft verlaufen. Hierfür spricht teilweise die schlechte Differenzierung der Basen bei diesen Sequenzen. Bei beiden Möglichkeiten werden keine genauen Übereinstimmungen mit bekannten Sequenzen gefunden. In der Northernblot-Hybridisierung sind nur die bekannten Sequenzen untersucht worden.

31 Sequenzen gehören zu 15 verschiedenen Genen, bei denen eine radioaktive Northernblot-Hybridisierung durchgeführt wurde und die unter 4.2 näher besprochen werden. Bis auf eine Sequenz, IL-8, wurden alle ein- oder zweimal gefunden. IL-8 wurde 15 mal gefunden. Es ist nicht auszuschließen, daß beim Picken der Klone zufällig ein Gen häufiger selektiert wird als andere. Da aber das Verhältnis von 15/1, bzw. 15/2 gegen eine zufällige Häufung spricht, ist eher davon auszugehen, daß das Angleichen der Abundanz der exprimierten Gene durch die SSH-Methode für das IL-8 nicht gut funktioniert hat.

Zwei Sequenzen gehören zum Klonierungsvektor. Hier ist es offensichtlich zu Fehlern bei der Integration der DNA-Abschnitte in den Vektor gekommen.

Jeweils zwei weitere Sequenzen gehören zu rRNA-Genen und zu einer CA-repeat-Regionen.

4.1.3.3 Radioaktive-Northernblot-Hybridisierung

Die radioaktiven Northernblot-Hybridisierungen werden durchgeführt, um zu überprüfen, ob die durch die SSH-Methode gefundenen cDNA-Abschnitte tatsächlich zu differentiell exprimierten Genen gehören.

Zunächst mußten Zellen der Ausgangszelllinie LN-405, gemäß den Bedingungen der Zellen für die mRNA-Gewinnung, TPA und Chelerythrin ausgesetzt werden. Um den zeitlichen Verlauf einer Expressionssteigerung zu zeigen, wurden die Zellen unterschiedlich lange mit TPA und vier Stunden mit Chelerythrin behandelt.

Da in einem Nebenversuch untersucht werden sollte, ob PTHrP möglicherweise dieselben Gene wie TPA über die PKC reguliert, wurde die Zelllinie LN-405 ebenfalls vier Stunden mit PTHrP behandelt.

Die hier eingesetzte Menge PTHrP(1-34) von 10^{-9} M ergibt sich aus der Arbeit von Gagnon et al. (1993). Dort wird gezeigt, daß PTHrP eine N-terminale Domäne (1-34) besitzt, die eine Aktivierung der membranständigen PKC mit Maxima in pico- und nanomolaren Konzentrationen bewirkt.

Um auch weitere Zelllinien in die Untersuchungen mit einzubeziehen, erfolgte eine jeweils vierstündige Behandlung mit TPA und Chelerythrin von drei anderen Astrozytomzelllinien (U-138, U-87, GAMG).

Die RNA wurde mit dem oben beschriebenen Verfahren isoliert und elektrophoretisch aufgetrennt. Daraufhin erfolgte der Northernblot. Dies ist ein Verfahren, bei dem die RNA-Moleküle aus der Gelmatrix eines Trenngels auf eine geeignete Trägerschicht aus Zellulose (Nitrocellulose in dieser Arbeit) oder Nylon übertragen und dort immobilisiert werden.

Der Nachweis bestimmter RNA-Moleküle erfolgt durch ihre Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten spezifischen Gensonde. Wenn die immobilisierte RNA auf der Trägermembran eine zu der Gensonde komplementäre Sequenz enthält, hybridisieren Sonde und RNA-Sequenz. Die spezifische RNA-Sequenz wird dann, nach Autoradiographie der Membran, als Bande auf einem Röntgenfilm sichtbar.

Die spezifischen Sonden wurden durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hergestellt.

Das Prinzip der PCR beruht auf der Amplifizierung eines spezifischen DNA-Abschnittes durch eine DNA-Polymerase. Die DNA-Polymerasen können einen Einzelstrang zum Doppelstrang aufpolymerisieren, sofern ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht.

In dieser Arbeit dienen die Nested-Primer 1 und 2, deren komplementäre Sequenzen im Verlauf der SSH im Randbereich der gefundenen cDNA-Abschnitte entstanden sind, als Ansatzstellen für die KlenTaq-Polymerase. Im ersten Schritt der PCR wird die Plasmid-DNA denaturiert, sie liegt damit einzelsträngig vor. Im nächsten Schritt hybridisieren die Nested-Primer an die entsprechende Stelle des zu amplifizierenden Stranges. Die durch Anhybridisierung der Primer entstandenen doppelsträngigen Bereiche dienen der Polymerase als Startpunkt für die Synthese des komplementären Stranges. Die notwendigen Schritte (Denaturierung, Hybridisierung des Primers an

den Einzelstrang und Polymerase-Reaktion) wurden 30mal durchgeführt, so daß der spezifische DNA-Strang 10^6 bis 10^7 -fach angereichert vorlag.

Um Verunreinigungen wie Salze, freie Nukleotide oder Proteine zu entfernen, wurde ein Waschschritt durchgeführt, bei dem Nukleinsäuren spezifisch an einen Träger gebunden werden und die Verunreinigung in Lösung bleiben. Nach dem Abnehmen der Lösung konnte die gebundene DNA wieder eluiert werden.

Die Proben wurden vor der radioaktiven Markierung auf einem Agarosegel aufgetrennt und überprüft. Die spezifische Sonde darf dabei nur eine Bande ergeben und entspricht der Höhe, die im EcoRI-Verdau der Plasmide gesehen worden ist (sofern im Insert nicht auch eine EcoRI-Schnittstelle enthalten ist).

Die Proben konnten dann mit [α - 32 P]dCTP markiert werden.

Dazu wurde ein zu den zuvor aufgereinigten Proben komplementärer Strang hergestellt. Als Primer für die DNA-Polymerase dienen Random-Primer. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer bestehen aus einem Gemisch praktisch aller denkbaren Oligonukleotide mit einer Länge von neun Basen, so daß die Random-Primer an die Template-DNA in statistischer Verteilung binden. Dadurch wird eine gleichmäßige Markierung der gesamten DNA erreicht. Ausgehend von den gebundenen Primern wird der Doppelstrang durch DNA-Polymerase in Gegenwart von dNTPs, darunter [α - 32 P]dCTP, aufgefüllt.

Die markierten Sonden können dann mit der auf den Membranen fixierten RNA hybridisieren, wenn eine zur Sonde komplementäre RNA vorhanden ist. Die so markierte Sequenz wird dann nach Autoradiographie des hybridisierten Filters als Bande sichtbar.

Mit der radioaktiven Northernblot-Hybridisierung wurden die 15 Sequenzen untersucht, die zu bekannten Genen gehören.

Für die Sequenz aus einem Gen, dem „Human alpha-2 collagen type VI gene, exons 1 und 2“, konnte keine radioaktive Northernblot-Hybridisierung durchgeführt werden. Gründe dafür mögen in einer fehlerhaften Sondenherstellung liegen. Bei den in dieser Arbeit nicht dargestellten Abbildungen der Northernblots kam es pro Bahn zu mehreren Banden, so daß eine Auswertung nicht möglich war.

Interessanterweise gehört das Alpha-2 Kollagen Typ VI aber zu Kollagen-Typen, die auch von Tumorzellen gebildet werden. Viele Hirntumorzelllinien sind dafür bekannt, Kollagen zu synthetisieren, darunter die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie U-87. Kollagene sind Bestandteil der extrazellulären Matrix. Diese vermittelt nicht nur Zell-Adhäsion und Migration sondern ist auch in die Tumordinvasion und Metastasierung involviert (Han et al. 1994). Da eine differentielle

Exprimierung in der Northernblot-Kontrolle nicht bestätigt werden konnte und in der Literatur kein Hinweis auf eine Verbindung zu TPA/PKC oder PTHrP zu finden ist, läßt sich somit keine Aussage darüber treffen, ob dieses Gen eher zu den falsch positiven (s.u.) oder zu den Genen gehört, die erstmalig als PKC-abhängig exprimiert gefunden wurden.

Alle anderen Ergebnisse der Auswertung der Blots werden nachstehend ausführlich diskutiert.

4.2 Diskussion der gefundenen Gene

Im nachfolgenden Diskussionsabschnitt werden die einzelnen Gene besprochen. Neben deren allgemeinen Funktionen und deren Bedeutung für die Zelle wird insbesondere auf ihre Beziehung zur Proteinkinase C eingegangen.

Für keines der gefundenen Gene konnte eine Expressionssteigerung nach PTHrP-Behandlung in der untersuchten Astrozytomzelllinie gefunden werden. Dies ist nach Literaturstand auch nur für das Interleukin-8, allerdings in einer Prostatakarzinomlinie, beobachtet worden (Gujral et al. 2001). Drei weitere Gene (ERM, ODC, INF- γ -R) haben eine beschriebene Verbindung zu PTHrP, die allerdings nicht deren Expression betreffen. Daher wird auch darauf nur kurz Bezug genommen.

4.2.1 Interleukin-8

Das in der vorliegenden Arbeit mit Abstand am häufigsten (15mal) identifizierte Gen ist das Interleukin-8. Die Northernblot-Kontrolle konnte in drei von vier Astrozytomzelllinien einen expressionssteigernden Effekt der TPA-Behandlung nachweisen.

IL-8 gehört zu den Chemokinen. Diese sind eine Gruppe von kleinen (4-8 kD), meist basischen, ähnlich strukturierten Molekülen, die die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Typen von Leukozyten durch Interaktion an einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor bewirken. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle in der Entwicklung, der Homöostase und im Immunsystem. Chemokine werden in zwei Hauptgruppen, CXC und CC, basierend auf den ersten beiden der ersten vier konservativen Cystein-Reste, eingeteilt. CXC-Chemokine werden weiter in ELR- und Non-ELR-Typen eingeteilt. ELR-Typen besitzen an ihrem NH₂-Ende die Aminosäuren Glu-Leu-Arg. Die Bezeichnung als ELR-Typen ergibt sich aus dem Einbuchstabencode der Aminosäuren.

Interleukin-8 ist ein Mitglied der CXC-Chemokin-Familie. Es ist ein wichtiger Aktivator der Neutrophilen und ist in eine Vielzahl von entzündlichen Prozessen involviert. IL-8 wird von vielen verschiedenen Zelltypen auf proinflammatorische Reize wie z.B. Cytokine, reaktive Oxidantien und Viren sezerniert. Die Regulation erfolgt hauptsächlich auf der Ebene der Transkription. Dabei gehört IL-8 zu den Early-Response Genen, die innerhalb von 60 min nach erfolgtem Reiz detektiert

werden können. Das IL-8 Gen ist auf Chromosom 4, q12-21, lokalisiert und besteht aus vier Exons, die durch drei Introns voneinander getrennt sind.

Der IL-8 Promotor beinhaltet eine einzelne Transkription-Initiierungsstelle mit einer TATA-Box am 5'-Ende und einem Polyadenylierungssignal am 3'-Ende. Der IL-8 Promotor ist eine Bindungsstelle für die induzierbaren Transkriptionsfaktoren AP-1, NF-IL-6 und NF- κ B (Roebuck 1999). Es ist anzunehmen, daß die Promotion der Transkription von IL-8 in Astrozytomen, ähnlich wie das z.B. von Okamoto et al. (1994) in T-Lymphozyten oder von Murayama et al. (1997) in einer Monozyten-Zelllinie beschrieben wird, über ein Zusammenspiel dieser durch TPA/PKC aktivierten Faktoren ausgelöst wird.

Die Transkription von IL-8 erzeugt eine 1,8 kB mRNA, die zu 99 Aminosäuren translatiert wird. Ein 79 Aminosäuren langes Protein entsteht nach Abspaltung eines Signalpeptids (Roebuck 1999).

Eine weitere wichtige Wirkung der CXC-Chemokine ist der Einfluß auf die Angiogenese. Dabei wird Ihre Eigenschaft, die Angiogenese zu fördern oder zu inhibieren, vom ELR-Motiv (Glu-Leu-Arg) am NH₂-Ende bestimmt. Diejenigen Chemokine, die dieses Motiv besitzen, wirken sich fördernd, solche, die dieses Motiv nicht besitzen, wirken sich hemmend auf die Angiogenese aus. Interleukin-8 gehört zu den die Angiogenese fördernden Chemokinen (Belperio et al. 2000). Mehrere Arbeiten belegen diesen Zusammenhang für IL-8 in verschiedenen Tumoren (Bronchialkarzinom: Smith et al. 1994, Ovarialkarzinom: Yoneda et al. 1998, NSCLC: Arenberg et al. 1996, Prostatakarzinom: Veltri et al. 1999).

Durch diese Eigenschaft ist IL-8 in einen direkten Zusammenhang mit der Tumorpromotion zu bringen, da die Angiogenese eine der Voraussetzungen für effektives Wachstum ist.

Palma und Manzini (1998) beschreiben die Stimulierbarkeit von IL-8 in einer Astrozytomzelllinie. Auch dort kommt es nach Behandlung der Zellen, im hier eingesetzten Konzentrationsbereich (nanomolare Konzentration), mit TPA zur Induktion von IL-8, während die Behandlung mit Staurosporin, einem PKC-Inhibitor, zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des IL-8-Spiegels führt.

In Prostatakarzinomzellen konnte ein stimulatorischer Effekt von PTHrP auf den IL-8-mRNA-Spiegel beobachtet werden, der allerdings nicht über die PKC reguliert wird (Gujral et al. 2001).

In unseren Versuchen mit der Astrozytomzelllinie LN-405 wurde kein Effekt nach PTHrP-Behandlung nachgewiesen.

4.2.2 Calpain

Calpain wurde insgesamt zweimal gefunden. Die Northernblot-Kontrolle zeigt in den Linien LN-405 und U-87 einen deutlichen Anstieg der Expression nach TPA-Behandlung, für die Linie GAMG ist dieser grenzwertig positiv (2,6 facher Anstieg).

Als Calpaine (durch Calcium aktivierbare neutrale Proteasen) bezeichnet man eine Familie von nicht lysosomalen, intrazellulären Cystein-Proteasen.

Die Calpain-Superfamilie wird in typische und untypische Calpaine eingeteilt. Zur ersten Gruppe gehören die ubiquitär, μ -Calpain (Calpain I) und m-Calpain (Calpain II), oder gewebespezifisch, Muskel (p95) und Magen (nCL-2), vorkommenden Isoenzyme (Suzuki und Sorimachi 1998).

Für die Aktivierung der Calpaine sind Ca^{2+} -Ionen zwingend notwendig. Daneben modulieren Aktivator-Proteine und Faktoren (z.B. Phospholipide), die die Ca^{2+} -Sensitivität erhöhen, diese Enzyme (Suzuki und Sorimachi 1998).

Wenn Calcium-Ionen an Calpain binden, transloziert dieses an die Zellmembran und entfaltet dort seine Protease-Aktivität. Nach der Substratspaltung bildet es mit Calpastatin einen Komplex und transloziert wieder in das Zytoplasma (Kawasaki und Kawashima 1996). Insgesamt ist die aktive Form der Calpaine sehr kurzlebig und katalysiert vermutlich nur einmal (Suzuki et al. 1992).

Calpaine bestehen aus zwei Untereinheiten. Die 30 kD schweren regulatorische Untereinheit ist für alle Calpaine gleich, die Unterschiede manifestieren sich in der 80 kD schweren katalytischen Untereinheit (Johnson 1990).

Die hier gefundene Sequenz stammt aus der größeren katalytischen Untereinheit des Calpain II. Diese besitzt in ihrer Promotor/Enhancer-Sequenz das TRE-Motiv (TPA-response element). Dieses ist direkt an der transkriptionalen Aktivierung durch PKC beteiligt (Hata et al. 1992).

Calpaine, insbesondere μ - und m-Calpain, sind in grundlegende und wesentliche zelluläre Funktionen involviert. Dieses zeigt sich im ubiquitären Vorliegen und der relativ einfachen Aktivierung über die Ca^{2+} -Konzentration. So ist die Liste möglicher Calpainsubstrate schier endlos. Unter anderem gehören dazu Membran-Proteine, Proteine des Cytoskeletts und Enzyme. Für diese Arbeit ist von besonderem Interesse, daß auch die PKC als Substrat beschrieben wird.

Wie oben schon erwähnt, translozieren beide Enzyme an die Zellmembran und entfalten dort ihre Wirkung. Die PKC wird von Calpain an der Zellmembran in zwei Domänen hydrolysiert. Somit wird die „down-regulation“ der PKC katalysiert. Calpain scheint die Signaltransduktion über TPA/PKC zu regulieren, da es einerseits die PKC, andererseits aber auch Transkriptionsfaktoren

wie c-Jun, und c-Fos hydrolisiert. Die durch TPA induzierte Synthese von Calpain hält dabei den Calpain-Spiegel konstant (Suzuki et al. 1992).

Möglicherweise wird Calpain aber auch über seine Funktion als Regulator für die PKC nach TPA-Behandlung hinaus überexprimiert. Eine interessante Folge der Calpain-Überexpression beschreiben Ray et al. (1999) für C6 Gliom-Zellen der Ratte. Dort kommt es neben der Überexpression von Calpain nach $\cdot\text{OH}$ -Stress, $\text{IFN-}\gamma$ -Stimulation oder Ca^{2+} -Einfluß zur Apoptose der Zellen. Die Provokation der Apoptose durch Calpain wird dadurch deutlich, daß sie durch Calpeptin, einem calpain-spezifischen Inhibitor, gehemmt wird.

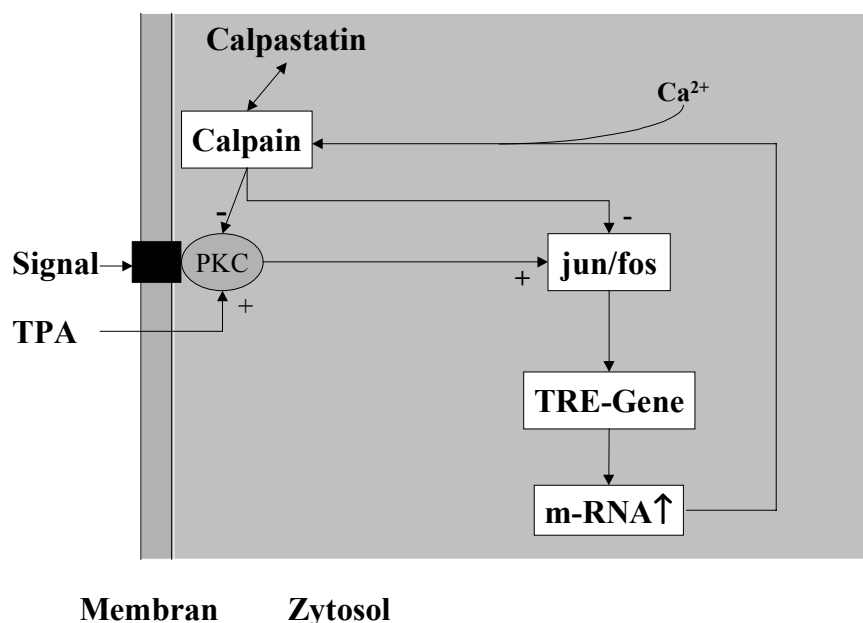


Abb. 29: Selbstlimitierende Regulation von Calpain und PKC. Schema nach Suzuki et al. 1992. Calpain reguliert die PKC und jun/fos durch Hydrolyse herunter. Die PKC wird über Zelloberflächenrezeptoren oder TPA aktiviert. Die aktivierte PKC führt zur Transkription von TRE-Genen, zu denen das m-Calpain gehört. Die Synthese von m-Calpain füllt den Verlust des Calpain-Pools, der durch die Down-Regulation von PKC und jun/fos entstanden ist, wieder auf. Nach Substratspaltung bildet Calpain mit Calpastatin einen Komplex und transloziert wieder ins Zytosol.

4.2.3 MHC-bindendes Protein 2

Für das MHC-bindende Protein 2 (MBP-2) zeigen alle drei untersuchten Zelllinien einen Anstieg der Expression nach TPA-Behandlung.

Das MBP-2 gehört zu einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren (H2TF1, NF- κ B, KBF-1, MBP-1 und MBP-2), die an der Enhancer-Sequenz A-region 1 der MHC I Gene binden (MHC = major histocompatibility complex = Haupthistokompatibilitätskomplex). Das MBP-2 ist ein Protein von 275 kD und enthält zwei Zinkfingerregionen und eine Trans-Aktivierungsdomäne.

Dabei scheint das MBP-2 im Gegensatz zu H2TF1, NF- κ B und KBF-1 ein negativer Regulator der Transkription von MHC I zu sein (Van't Veer et al. 1992). Dieses deckt sich mit der Beobachtung, daß der Spiegel der MBP-2-mRNA im Hirngewebe besonders hoch ist, während gleichzeitig die Expression von MHC I Antigen sehr niedrig ist (David-Watine et al. 1990). Hunáková et al. (1993) beschreiben, daß TPA über einen PKC-vermittelten Weg MHC I Antigen in einer monocytären Zelllinie vermindert, ohne den genauen Mechanismus zeigen zu können.

Der MHC besteht aus einer Multigen-Familie, deren Produkte eine wesentliche Rolle in der zell-vermittelten Immunantwort sowie in der nicht-immunologischen Zell-Zell-Interaktion spielen.

Antigene werden von T-Lymphozyten erkannt, wenn sie, verbunden mit dem MHC, an der Zelloberfläche präsentiert werden. Dabei präsentieren Proteine des MHC I von den Zellen selbst gebildete virale- oder tumorassoziierte Antigene. Zytotoxische T-Lymphozyten, die ihre Zielzellen direkt lysieren, werden von Antigen/MHC I angelockt. Neben der lytischen Funktion sezernieren zytotoxische T-Lymphozyten auch einige der immunaktiven Zytokine, die auch von Helfer-T-Zellen gebildet werden (Lampson et al. 1994).

In vielen Tumorzelllinien ist die MHC I Expression niedrig (David-Watine et al. 1990), gerade auch Astrozytome gehören zu diesen Tumoren (Lampson und Hickey 1986). Die defizitäre MHC-Expression gehört bei vielen Tumoren zu den Mechanismen, mit denen sie eine effiziente immunologische Antwort verhindern (Restifo et al. 1993, Parney et al. 2000). So fördert eine kombinierte Defizienz von KBF-1 und NF- κ B die Tumorpromotion durch den Verlust der MHC I Expression (Ting und Baldwin 1993).

Die Expressionsteigerung des MBP-2 nach PKC-Aktivierung wurde zum ersten Mal in den hier beschriebenen Untersuchungen nachgewiesen und gehört möglicherweise zu den Mechanismen, durch die eine effektive Bekämpfung der Tumorzellen durch das Immunsystem verhindert wird.

4.2.4 β_2 -adrenerger Rezeptor

Das Gen für den β_2 -adrenergen Rezeptor wurde nach TPA-Behandlung in insgesamt zwei Zelllinien differentiell exprimiert gefunden.

Der β_2 -adrenerge Rezeptor (β_2 AR) ist ein Mitglied einer großen Familie von Zelloberflächenrezeptoren, die nach Bindung von Katecholaminen die Vermittlung der Signal-Transduktion durch Dissoziation der G-Proteine bewirken. Die Aktivierung des G-Protein über den β_2 AR führt zur Stimulation der Adenylatzyklase, die die Konversion von ATP zu cAMP katalysiert. cAMP agiert als der klassische „second messenger“ über die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinasen, die verschiedene Substrate phosphorylieren (Liggett 1999, 2000). Die zelluläre Antwort auf die Katecholamine wird durch die Art des Rezeptors (α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 -AR) und durch deren Verhältnis bestimmt. In einzelnen Geweben wird deren Verhältnis durch externe Faktoren wie Temperatur und verschiedene Hormone moduliert (Emorine et al. 1987). Der β_2 -adrenerge Rezeptor ist ein Glykoprotein und wird nahezu überall im menschlichen Körper gefunden (Stiles et al. 1983).

Der Einfluß der PKC auf den β_2 -adrenergen Rezeptor erfolgt auf drei Ebenen. Zum ersten erfolgt eine schnelle Desensibilisierung des Rezeptors durch PKC-katalysierte Phosphorylation (Kelleher et al. 1984, Bouvier et al. 1991). Weiterhin wird eine zeitabhängige Downregulation des β_2 AR mRNA-Spiegels nach Behandlung mit TPA beobachtet, gefolgt von einer Downregulation der β_2 AR-Bindungsaktivität (Leavitt et al. 2001).

Ein weiterer bekannter Einfluß der PKC auf den β_2 AR ist die Stimulierung der Expression der β_2 -adrenergen Rezeptor-Kinase. Diese führt durch Phosphorylierung des β_2 -adrenergen Rezeptors ebenfalls zu dessen Desensibilisierung (De Blasi et al. 1995).

Die in dieser Arbeit beobachtete Expressionssteigerung des β_2 AR nach TPA-Behandlung in zwei Astrozytomzelllinien steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Leavitt et al. (2001), die nach Behandlung von Gliom-Zellen der Ratte mit 0,2 μ M TPA eine Downregulation der Rezeptor-mRNA beschrieben haben. Möglicherweise stellt der beobachtete Anstieg der Expression einen Mechanismus dar, der Verluste ausgleicht, die durch die PKC-abhängige Phosphorylierung des β_2 AR entstehen.

4.2.5 M-Phase Phosphoprotein-1

Das M-Phase Phosphoprotein-1 (MPP1) wurde in der Zelllinie LN-405 als differentiell exprimiert nach TPA-Behandlung nachgewiesen. Für die anderen Zelllinien ließ sich dieses nicht zeigen.

Der Übergang der Zellen von der Interphase zur Mitose beinhaltet eine große Zahl von Veränderungen zellulärer Strukturen und Aktivitäten. Der G₂/M-Übergang wird durch den M-phase-promoting factor (MPF) induziert. In der M-Phase werden viele Proteine direkt durch MPF oder indirekt durch Kinasen, die durch MPF aktiviert werden, phosphoryliert. Der Umbau von Interphasestrukturen, wie z.B. die Auflösung der Kernmembran oder die Verdoppelung des Zentrosoms, und der Aufbau von enzymatischer Aktivität und Strukturen der M-Phase werden von den M-Phase-Phosphoproteinen bewerkstelligt. Zu diesen Proteinen gehört das MPP1 (M-Phase Phosphoprotein-1) (Westendorf et al. 1994, Matsumoto-Taniura et al. 1996). Allerdings ist über seine genaue Funktion bisher wenig bekannt.

Die MPP1 cDNA ist 2565 bp lang. Ein besonderes Merkmal ist das Vorliegen einer coiled-coil Domäne. Diese bildet sich durch Paarung von zwei α -helikalen Untereinheiten, die eine sich wiederholende Anordnung von nicht-polaren Seitenketten haben. Die zwei α -helikalen Untereinheiten sind identisch, laufen parallel, winden sich umeinander und bilden so einen steifen Faden. Proteine mit einer solchen, auch als Doppelwendel bezeichneten Struktur, können an DNA binden und sind somit hauptsächlich regulatorisch wirksam (Fritzler et al. 2000). Außerdem vermitteln diese Strukturen die Dimerisation mehrerer Transaktivatoren, so daß es möglicherweise zu Komplexen zwischen MPP1 und anderen Proteinen kommt (Landschulz et al. 1988).

Barboule et al. (1999) beschreiben die Bedeutung der PKC für die Regulation des G₂/M-Übergangs von MCF-7 Zellen. Sie zeigen, daß TPA über den Raf-1 und den MAPK-Signalweg unter anderem zur Induktion von p21, einem Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), führt. Die Zell-Zyklus-Progression benötigt die Aktivierung dieser Kinasen und wird durch p21 gestoppt.

Livneh und Fishman (1997) geben eine Übersicht über die Verbindung zwischen PKC und der Zellzyklus-Kontrolle. Dabei gibt es neben dem oben beschriebenen Mechanismus zahlreiche andere, die nicht zuletzt von den verwendeten Zelllinien, den verschiedenen PKC-Isoenzymen und dem Zeitpunkt der Aktivierung durch TPA abhängen. Das MPP1 wird in diesem Zusammenhang nicht erwähnt, auch findet sich in der Literatur kein Hinweis auf eine Verbindung zu TPA oder PKC, so daß in dieser Arbeit die Steigerung der Expression dieses Proteins nach TPA-Behandlung zum ersten Mal beschrieben wird. Es ist anzunehmen, daß das MPP1, ähnlich wie das p21, eine Teilfunktion in den komplexen Auswirkungen der PKC auf die Regulation des Zell-Zyklus hat.

4.2.6 Cosmid F0811

Für die Sequenz aus dem Cosmid F0811 konnte durch Northernblot-Kontrolle in den Zelllinien LN-405 und U-87 eine Expressionssteigerung nach TPA-Behandlung nachgewiesen werden. Da aber die Ergebnisse der Sequenzierung sehr schlecht waren und keine eindeutige Übereinstimmung mit einem bisher genau definierten Abschnitt gefunden wurde, ist die Zuordnung zum Cosmid F0811 aber fraglich, so daß sich über eine mögliche Funktion keine Aussage treffen läßt.

4.2.7 ect2-Onkogen

Das ect2-Onkogen wurde in zwei Zelllinien als differentiell exprimiert nach TPA-Behandlung sicher nachgewiesen. In einer weiteren Zelllinie (U-87) stieg die Expression um den Faktor 2,6, also knapp unter den festgesetzten Grenzwert von drei.

Das ect2-Onkogen hat Sequenzähnlichkeiten mit dem „breakpoint cluster gene“ (bcr), dem Zell-Zyklus-Gen CDC24 der Hefe und dem dbl-Onkogen. Alle diese Gene kodieren für regulatorische oder Effektor-Moleküle der „Rho-like small GTP-binding proteins“. Das ect2-Onkogen ist ein Mitglied einer expandierenden Familie, deren Angehörige transformierende Eigenschaften haben und mit Rho-like Proteinen der Ras-Superfamilie interagieren (Miki et al. 1993).

Tatsumoto et al. (1999) beschreiben die Bedeutung des ect2-Onkogen für den Zellzyklus. Das ect2-Onkogen katalysiert den Guanin-Nukleotid-Austausch der Rho-GTPasen, RhoA, Rac1 und CDC42. Die Rho-GTPasen wirken als molekulare Schalter, die verschiedene biologische Prozesse leiten, wie Zytoskelett-Organisation, Zell-Motilität, Zytokinese u.a. (Hall 1998).

Die Expression von ect2 steigt in der S- und G2/M-Phase deutlich an (Sakata et al. 2000), außerdem findet in der G2- und M-Phase die für seine Aktivierung notwendige Phosphorylierung statt.

Das ect2-Onkogen scheint ein wichtiges Element für die Regulation der Zytokinese (Zellteilung) über den Rho-Signalweg zu sein. Es konnte gezeigt werden, daß ect2-Antikörper die Zytokinese inhibieren (Tatsumoto et al. 1999). Über die genauen Mechanismen der zugrundeliegenden Expressions- und Regulationswege ist aber noch wenig bekannt. In der Literatur ist kein Hinweis auf einen Zusammenhang mit TPA oder PKC zu finden.

Damit ist das ect2-Onkogen, neben dem MPP1, das zweite der in diesen Untersuchungen bearbeiteten Gene, das erstmals als differentiell exprimiert nach TPA-Behandlung beschrieben wird. Beide stehen im Zusammenhang mit dem Zellzyklus in der G2/M-Phase.

4.2.8 Methionin-Adenosyltransferase alpha

Für die Methionin-Adenosyltransferase alpha (MAT) konnte der Nachweis der differentiellen Expressierung nach PKC-Stimulierung für die Zelllinie LN-405 nachgewiesen werden.

Im menschlichen Organismus kommt die MAT in drei verschiedenen Isoformen vor. Die Formen I und III werden hauptsächlich in der Leber synthetisiert und bestehen als Tetramer (MAT I) und als Dimer (MAT III) aus einer identischen katalytischen α_1 -Untereinheit. Die MAT II wird auch in allen anderen bisher untersuchten Geweben, einschließlich Hirngewebe, gefunden und besteht als Hetero-Oligomer aus der α_2 - (53 kD), der α_2' - (51 kD) und der β -Untereinheit (38 kD). Dabei geht die α_2' -Untereinheit durch posttranslationale Modifikation aus der α_2 -Untereinheit hervor (Kotb und Kredich 1985, Kotb und Geller, 1993). Die α_2 - und die α_2' -Untereinheiten sind für die enzymatische Aktivität verantwortlich, die β -Untereinheit hat regulatorische Funktionen (Halim et al. 1999, LeGros et al. 2000). Das entsprechende Gen der in dieser Arbeit gefundenen α_2 -Untereinheit ist auf Chromosom 2 (2p11.2) codiert (De La Rosa et al. 1995).

Die Methionin-Adenosyltransferase katalysiert die Biosynthese von S-Adenosylmethionin aus Methionin und ATP. S-Adenosylmethionin ist der wichtigste Methylgruppendedonator im Zellstoffwechsel. Die Methylierung ist essentiell für die Synthese und Modifikation von Proteinen und Lipiden. Durch die Methylierung von DNA kann die Expression von Genen kontrolliert werden. Daneben ist S-Adenosylmethionin notwendig für die Biosynthese der Polyamine (Spermidin und Spermin), die u.a. in der Proteinbiosynthese und im Zellwachstum eine wichtige Rolle spielen (Tabor und Tabor 1984). Hieran wird die herausragende Stellung von S-Adenosylmethionin, und damit der MAT, im Metabolismus deutlich. Die MAT ist Bestandteil des Genoms für den kleinsten bekannten sich selbst replizierenden Organismus (*Mycoplasma genitalium*) und gehört damit zur Grundausrüstung an Genen der Zellen (Fraser et al. 1995).

Der variable Spiegel an S-Adenosylmethionin in verschiedenen Geweben und in den unterschiedlichen Stadien der Gewebsdifferenzierung deutet auf die wichtige Rolle hin, welche die Regulation der S-Adenosylmethionin-Synthese für Zellwachstum und Differenzierung einnimmt. Daher ist es auch nicht verwunderlich, daß in vielen Tumorgeweben besonders hohe MAT-Aktivität gemessen werden kann (Åkerman et al. 1991). Die Hochregulierung der Expression der α_2 -Untereinheit verursacht einen Anstieg des intrazellulären S-Adenosylmethionin-Spiegels (Halim et al. 2001).

Zwar konnten Tobena et al. (1996) den Anstieg in Lymphozyten, Zeng et al. (2001) in Jurkat-Zellen zeigen. Jedoch wird in dieser Arbeit der Anstieg der Expression der MAT nach PKC-Aktivierung für Astrozytomzelllinien das erste Mal nachgewiesen. Der genaue Mechanismus, der nach PKC-Stimulation zu einer MAT-Expression führt, ist allerdings noch nicht bekannt. Tobena et al. (1996) vermuten, daß die Expression der MAT nach PKC-Stimulierung über den Raf-1-Pathway reguliert

wird. Eine weitere Möglichkeit der Regulation wäre, daß der Anstieg des c-Myb mRNA-Spiegels zur Expression der MAT führt. c-Myb ist ein Transkriptionsfaktor, für den die MAT- α_2 -Untereinheit im Promotor eine Bindungsstelle enthält (Halim et al. 2001). In Jurkat-Zellen führt die durch Phorbol-Ester induzierte PKC-Aktivierung zur MAT-Expression über einen Anstieg der c-Myb Expression (Zeng et al. 2001).

In dieser Arbeit ist neben der MAT ein weiteres Gen gefunden worden, das einen Einfluß auf den Polyaminspiegel hat. Allerdings hat das Ornithin-Decarboxylase-Antizym 2, welches unter 4.2.13 noch ausführlich besprochen wird, im Gegensatz zur MAT eine den Polyaminspiegel senkende Wirkung.

4.2.9 PAC-Klon

Für die Sequenz, die einen Teil des PAC-RP4-751E10-Klons enthält, ist die Northernblot-Kontrolle ebenfalls negativ ausgefallen. Mutmaßlich liegt die Ursache für die Ergebnisse dieser Sequenz in einer fehlerhaften Klonierung, da trotz mehrfacher Sequenzierungsversuche keine saubere Sequenz gefunden werden konnte.

4.2.10 ERM-Gen

Das Ets-related Molecule PEA3-like (ERM-Gen) wurde in zwei Zelllinien als differentiell exprimiert nach TPA-Behandlung identifiziert.

Die Ets-verbundenen Gene, zu denen das ERM-Gen gehört, bilden eine große Familie von Transkriptionsfaktoren, die signalabhängige Regulatoren der Gen-Expression sind und deren gemeinsames Merkmal die Ets-Domäne ist. Diese besteht aus ungefähr 85 Aminosäuren und ist für die DNA-Bindung verantwortlich. Die Ets-Transkriptionsfaktoren sind in Proliferation, Differenzierung und Tumorgenese involviert. Eine große Anzahl von Promotoren die eine aktive Ets-Bindungsstelle enthalten wurde bisher identifiziert. So sind Ets-Faktoren z.B. in die Regulation von Membranrezeptoren, Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren und Metalloproteinasen involviert (de Launoit et al. 1997).

Innerhalb der Ets-Gene bildet das ERM-Gen zusammen mit PEA3 und ER81 eine Gruppe. Diese drei verbindet eine 95%ige Übereinstimmung in ihrer Ets-Domäne, die für die DNA-Bindung verantwortlich ist, und eine Übereinstimmung von 50% in der gesamten Aminosäure-sequenz. Das ERM-Gen ist ubiquitär exprimiert, mit hohen Spiegeln in Gehirngewebe und Plazenta (Monté et al. 1994).

Die genaue Funktion oder Regulation des ERM-Gens ist noch weitgehend unklar. Die Regulation der Transkription ist ein sehr komplexer Vorgang. In vielen Fällen kooperieren verschiedene Transkriptionsfaktoren miteinander, um eine optimale Genaktivierung zu erreichen. Die Ets-

Proteine scheinen für eine effiziente Aktivität andere Transkriptionsfaktoren zu benötigen. So wird die Transkriptionsaktivität des ERM-Faktor durch den Faktor c-Jun deutlich erhöht (Nakae et al. 1995). Hier besteht auch ein Zusammenhang mit TPA/PKC, da c-Jun durch Dephosphorylierung mittels der Jun-Phosphatase aktiviert wird. Die Jun-Phosphatase wiederum wird durch TPA oder andere PKC-Stimulatoren aktiviert (Foletta 1996).

Ein weiterer Zusammenhang besteht darin, daß die Aktivierung des Ras/Raf-1/MAPK-Pathway zu einer Erhöhung der ERM-Aktivität führt (Janknecht et al. 1996). TPA-Einfluß führt über die PKC zu einer Aktivierung der MAP-Kinase (Yamaguchi et al. 1995).

Über eine Expressionssteigerung des ERM-Faktors nach TPA-Behandlung ist bisher nicht berichtet worden. Es liegt aber nahe, daß sie synergistisch zur Aktivitätserhöhung des c-Jun und Einleitung des Ras/Raf-1/MAPK-Pathway ausgelöst wird, um eine effiziente Transkription zu erreichen.

Eine Expressionssteigerung für das ERM-Gen nach PTHrP-Behandlung konnte nicht nachgewiesen werden. Eher wird die Transkription des PTHrP von Ets-Transkriptionsfaktoren beeinflusst, denn für den PTHrP-Promotor wird eine Bindungsstelle für einen Ets-Transkriptionsfaktor (Ets1) vermutet (Dittmer et al. 1997).

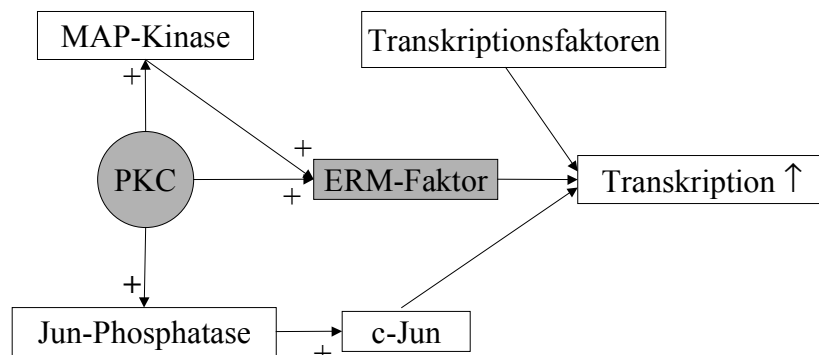


Abb. 30: Regulation des ERM-Faktors über die PKC. Die PKC reguliert den ERM-Faktor auf drei Wegen. Zum Ersten führt die Aktivierung des MAPK-Pathway zu einer Erhöhung der ERM-Aktivität. Zum Zweiten wird die Transkriptionsaktivität des ERM-Faktors durch den c-Jun-Faktor verbessert. Der c-Jun Faktor wird durch Dephosphorylierung durch die Jun-Phosphatase aktiviert. Die Phosphatase wird durch die PKC stimuliert. Zum Dritten wird die Transkription des ERM-Faktors durch die PKC angeregt.

4.2.11 PVT

Für die „Human transcription unit PVT“ wurde im Northernblot der Nachweis für eine differentielle Expression nicht erbracht. Der Anstieg der Expression in der Zelllinie GAMG von 2,8 reicht bei dem gegebenen Grenzwert von drei nicht aus, um einen signifikanten Anstieg anzunehmen. Daher muß das Ergebnis als falsch positiv bewertet werden. Auch in der Literatur findet sich kein Hinweis auf einen Zusammenhang mit PKC oder TPA.

4.2.12 Metallopanstimulin

Auch für Metallopanstimulin, das zweimal gefunden wurde, konnte keine Expressionssteigerung nach TPA-Behandlung im Northernblot nachgewiesen werden. Obwohl Metallopanstimulin als Vermittler zellulärer proliferativer Antwort auf verschiedene Wachstumsfaktoren und andere Signale diskutiert wird und in einem Zusammenhang mit der Tumorpromotion durch TPA stehen könnte, finden sich in der Literatur keine Hinweise auf eine Verbindung zur Proteinkinase C, Phorbol-Ester oder Astrozytomen.

4.2.13 Ornithin-Decarboxylase-Antizym 2

Das Ornithin-Decarboxylase-Antizym 2 wurde in zwei Zelllinien (LN-405, U-138) nach TPA-Behandlung als differentiell exprimiert identifiziert.

Die Antizyme sind eine Gruppe von drei 26,5 kD Proteinen, die inhibitorisch auf den Polyamin-Spiegel wirken. Antizym 1 und 2 werden ubiquitär, Antizym 3 spezifisch im Hodengewebe gefunden.

Die intrazelluläre Konzentration der Polyamine ist entscheidend für eine Vielzahl von Prozessen, wie Proteinsynthese und Wachstumskontrolle. Die Konzentration der Polyamine wird über drei Wege reguliert: Produktion, Transport (Einstrom in die Zelle) und Abbau. Antizyme haben einen hemmenden Einfluß auf Produktion und Transport.

Antizyme entfalten Ihre Wirkung auf die Polyamine-Biosynthese durch die Blockierung des Schlüsselenzyms ihrer Synthese, der Ornithin-Decarboxylase (ODC). Dabei führt die Überexpression von ODC zu Transformation und Tumorgenese. Die Antizyme schützen vor abnormaler Anhäufung und Toxizität der Polyamine und inhibieren das Zellwachstum (Coffino 2001, Ivanov et al. 1998).

Die ODC ist als Monomer enzymatisch aktiv. Durch die Bindung des Antizyms mit der ODC entsteht ein Antizym-ODC Heterodimer, das enzymatisch nicht mehr aktiv ist (Murakami et al. 1985).

Ein weiterer Weg der Antizyme, die Aktivität der ODC zu hemmen, ist deren Einfluß auf das Proteasom. Auch ohne den Einfluß von Antizymen ist die ODC ein Substrat für die Protease 26S-

Proteasom, mit einer Halbwertszeit der ODC von ein oder zwei Stunden. Durch Bindung von Antizyminen mit der ODC wird sie auf wenige Minuten reduziert (Murakami et al. 2000).

Durch Inhibition eines Transporters, der für die Aufnahme von Polyamin in die Zelle nötig ist, wird der Polyamin-Pool durch Antizyme weiter verringert (Mitchell et al. 1994). Die Aktivierung der Antizyme wird durch Polyamine selbst beeinflusst. Dabei wird die Antizymkonzentration durch Polyamine auf der Transkriptions- und Translationsebene reguliert. Die Regulation auf der Transkriptionsebene ist noch weitgehend unklar, auf der Translationsebene bewirken Polyamine einen deutlich effizienteren „Frameshift“, der Voraussetzung für eine Translation des Antizyms ist. Der genaue Mechanismus muß aber noch aufgeklärt werden (Matsufuji et al. 1995, Nilsson et al. 1997).

Noch nicht bekannt ist, wie die negative „Feedback“-Regulation von Polyamin und Antizym über die ODC aufgebrochen wird, wenn ein höherer Bedarf an Polyaminen besteht.

Der Unterschied zwischen den ubiquitär exprimierten Antizyminen 1 und 2 besteht darin, daß durch das Antizym 2 die Degradation von ODC durch Proteasomen nicht beeinflusst wird. Das Antizym 2 gilt als reversibler Inhibitor der ODC, der nur durch Dimer-Bildung und Transporthemmung wirkt (Zhu et al. 1999).

Über einen Zusammenhang von TPA/PKC und der Expression von Antizym ist bisher nicht berichtet worden. Hingegen ist schon lange bekannt, daß Phorbol-Ester die Aktivität der ODC und damit auch die Konzentration an Polyaminen erhöhen (Yuspa et al. 1976, O'Brian und Diamond 1977). Außerdem induziert TPA über PKC sowohl die ODC mRNA- als auch die Proteinsynthese (Tseng et al. 1994).

Daher kann hier nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die in dieser Arbeit gezeigte Expressionssteigerung des ODC-Antizym 2 tatsächlich auf den Einfluß von TPA/PKC zurückzuführen ist oder die Steigerung durch den oben beschriebenen „Feedback“-Mechanismus als Folge einer über TPA zustande gekommenen Aktivierung der ODC mit Erhöhung des Polyaminspiegels und nachfolgender Transkriptionssteigerung des Antizyms bewirkt wird.

Ein stimulierender Effekt auf das Ornithin-Decarboxylase Antizym 2 nach PTHrP-Behandlung konnte nicht nachgewiesen werden. Der Einfluß von PTHrP auf die ODC wurde von Yu et al. (1992) beschrieben. Diese konnten in einer Kolon-Zelllinie nachweisen, daß sowohl die ODC-Aktivität als auch der ODC-mRNA-Spiegel nach PTHrP-Behandlung ansteigt.

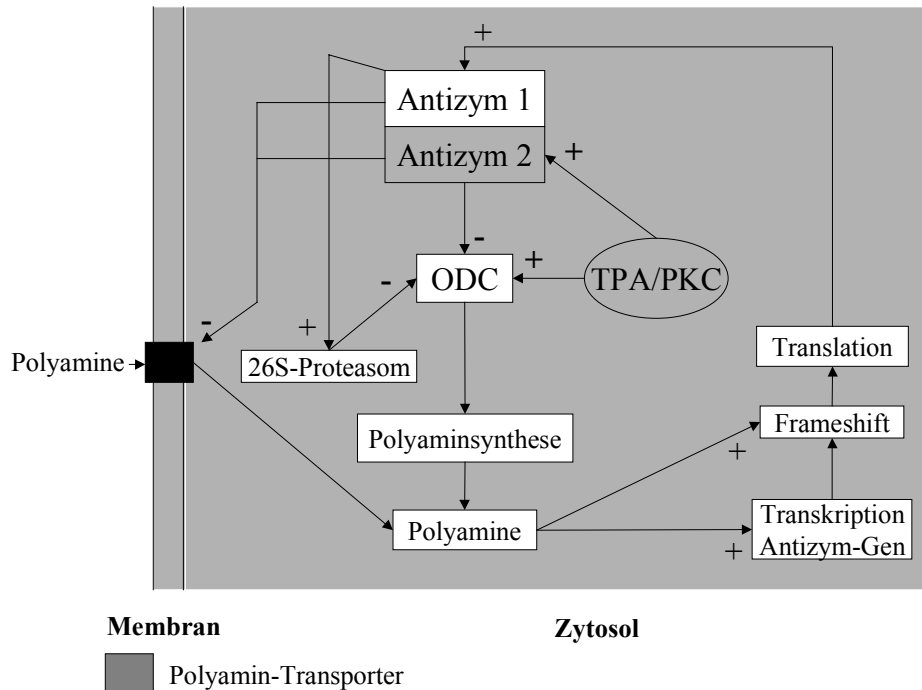


Abb. 31: Schema der Autoregulation von Antizymen und Polyaminen unter Berücksichtigung der PKC. Die PKC erhöht die Aktivität der ODC, dem Schlüsselenzym der Polyaminsynthese. Die Polyamine erhöhen über Transkriptionsförderung und Frameshift, der für eine effiziente Translation von Antizym notwendig ist, den Antizym-Pool. Gleichzeitig erhöht die PKC den Antizym 2-Pool. Antizym 2 hat einen hemmenden Einfluß auf den Polyamineinstrom und auf die ODC. Die ODC wird außerdem durch Proteasom degradiert.

4.2.14 Interferon- γ Rezeptor 2

Der Interferon- γ Rezeptor 2 (auch: akzessorischer Faktor 1 (AF-1), Interferon gamma transducer, Interferon- γ Rezeptor β -Kette) wurde in drei der untersuchten Zelllinien nach TPA-Behandlung als differentiell exprimiert nachgewiesen.

Interferone sind multifunktionelle Glykoproteine mit einem großen Spektrum antiviraler, antiproliferativer und immunoregulatorischer Eigenschaften an der Zielzelle. Zusammen mit den Interleukinen, den Tumor-Nekrose-Faktoren und den Kolonie-stimulierenden-Faktoren werden sie als Cytokine bezeichnet.

Die Einteilung der Interferone erfolgt in drei Klassen (Typ I-Interferone: α und β , Typ II-Interferon: γ). Die Ausbildung der biologischen Aktivität erfordert die Bindung an einen spezifischen Oberflächenrezeptor der Zielzelle. Dabei hängt die Zahl und Spezifität der Rezeptoren auch vom Zellzyklus und der Zelldifferenzierung ab (Günther und Otto 1993).

Die immunoregulatorischen Eigenschaften der Interferone beruhen im Wesentlichen auf der Induktion der Transkription der Zelloberflächenantigene des MHC I und MHC II. Aber auch die Fähigkeit der Interferone, die Cytotoxizität der Makrophagen und Phagozytose zu potenzieren, spielt eine wichtige Rolle (Farrar und Schreiber 1993). Für die antiproliferative und antitumorale Wirkung wird u.a. ein Einfluß auf den Zellzyklus, mit Arretierung in der G₀/G₁-Phase, diskutiert.

Das Interferon- γ (Immuninterferon) zeigt insgesamt eine stärkere Induktion von immunoregulatorischen Zelloberflächenantigenen (vor allem MHC I) als die Typ I-Interferone. Ein weiteres Merkmal des Interferon- γ ist die Aktivierung von Makrophagen. Sowohl deren Ausdifferenzierung zu Monozyten als auch deren cytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen und Mikroorganismen werden durch Interferon- γ ausgelöst. Seine Wirkung entfaltet es über Bindung an seinen spezifischen Rezeptor (IFN- γ -R), der an der Zelloberfläche aller Zellen exprimiert wird (Günther und Otto 1993).

Der aktive Interferon- γ Rezeptor besteht aus 2 verschiedenen Polypeptiden. Einmal aus dem IFN- γ -R selbst, der für die Bindung von Interferon- γ nötig ist und auf Chromosom 6 codiert wird, und einem weiteren Peptid, das für die Vermittlung der funktionellen Antwort verantwortlich ist und auf Chromosom 21 codiert ist (Jung et al. 1987, Hemmi et al. 1994). Ein Ausschnitt aus der Sequenz dieses akzessorischen Faktors (Interferon- γ Rezeptor 2) ist in dieser Arbeit gefunden worden. Die genaue Wirkungsweise des AF-1 ist noch weitgehend unklar, dieser wird aber unbedingt benötigt, um die von Interferon- γ induzierte Expression von MHC I zu bewerkstelligen. Wahrscheinlich interagiert die extrazelluläre Domäne des IFN- γ -R mit dem AF-1. Es wird angenommen, daß mehrere solcher Faktoren existieren, die für die unterschiedlichen Antworten einzelner Gewebe auf Interferon- γ verantwortlich sind (Soh et al. 1994).

Der in dieser Arbeit gezeigte Anstieg der Expression des IFN- γ Rezeptor 2 bestätigt Ergebnisse von Sakamoto et al. (1999, 2001). Diese konnten zeigen, daß die Expression sowohl des Interferon- γ Rezeptor 1 als auch des Interferon- γ Rezeptor 2 (AF-1) nach TPA-Behandlung von Monozyten ansteigt.

Einen weiteren Zusammenhang zwischen der PKC und dem Interferon- γ beschreiben Benveniste et al. (1991). Nach Aktivierung der PKC durch Interferon- γ wird in Astrozyten die Expression von MHC II induziert.

Schon 1988 wiesen Fan et al. nach, daß bei der Induktion einiger Gene (γ 1, HLA-DR), deren Transkription von Interferon- γ induziert wird, in Makrophagen die Regulation über die PKC realisiert wird.

Die Behandlung von LN-405 Zellen mit PTHrP hat keinen Einfluß auf die Expression des Interferon- γ Rezeptor 2. In Nierenzellen konnte eine Verbindung zwischen PTHrP und Interferon- γ hergestellt werden. Dort hat Interferon- γ -Einfluß einen negativen Effekt auf die PTHrP Expression (Funk et al. 1994).

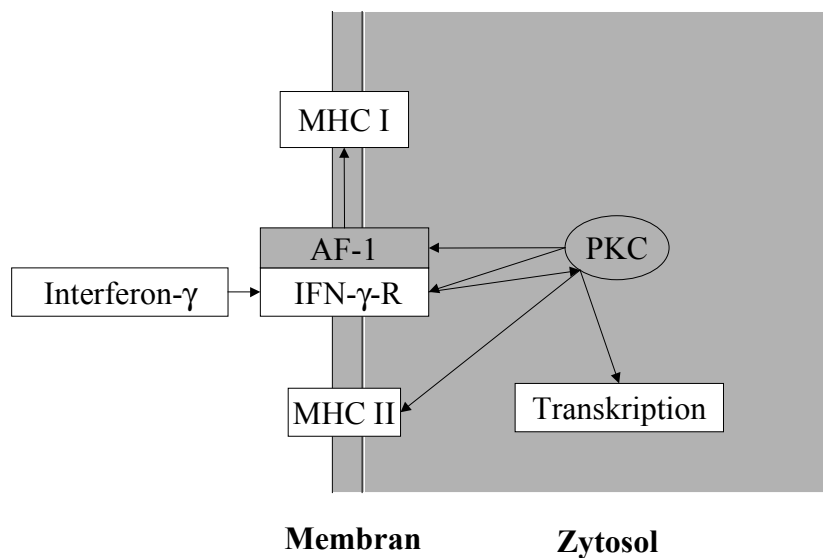


Abb. 32: Einfluß der PKC auf IFN- γ -R, AF-1 und MHC. Die Aktivierung der PKC führt zu einem Expressionsanstieg von IFN- γ -R und AF-1. Nach Bindung von IFN- γ an seinen Rezeptor kommt es u.a. zur Induktion der Zelloberflächenantigene MHC I und II. Die Induktion der Transkription einiger anderer Gene durch IFN- γ (zumindest in Astrozytomen auch des MHC II) wird über die PKC reguliert.

4.3 Bewertung und Zusammenfassung der Ergebnisse

Die meisten Hirntumore gehen mit molekulargenetischen Läsionen einher, wie z.B. die Deletion von Differenzierungsgenen bzw. Tumor-Suppressorgenen. Mit fortschreitender Entdifferenzierung der Tumorzellen kommt es zu weiteren Gendefekten, so daß bei den eingesetzten Astrozytomzelllinien, die den WHO-Graden III und IV entsprechen, der genetische Bestand, bzw.

der fehlerfrei ablesbare, differieren kann. Das ist eine mögliche Erklärung dafür, daß die gefundenen Gene nicht in allen Zelllinien als differentiell exprimiert nach TPA-Behandlung gefunden wurden.

Zusammenfassend läßt sich über die gefundenen Sequenzen sagen, daß sechs Gene (MPP1, ect2-Oncogen, ERM-Gen, ODC-Antizym 2, MBP-2, Sequenz aus Cosmid F0811) erstmalig als TPA-abhängig exprimiert nachgewiesen wurden. IL-8, Calpain, die Methionine-Adenosyltransferase alpha und der Interferon- γ Rezeptor 2 sind bereits in anderen Arbeiten als PKC-abhängig exprimiert beschrieben worden, davon IL-8 und Calpain auch in Astrozytom- bzw. Gliom-Zellen.

Die in dieser Arbeit gefundene Expressionssteigerung des β_2 AR steht im Gegensatz zu Ergebnissen einer anderen publizierten Untersuchung.

Die Expression des PAC-RP4-751E10-Klon, der Human-transcription-unit PVT, und des Metallopanstimulin stieg in der Northernblot-Kontrolle nicht, so daß diese Gene als falsch positiv gewertet werden müssen.

Die beschriebenen Effekte von PTHrP auf die Expression von IL-8 in Prostatakarzinomzellen konnten für die untersuchte Astrozytomzelllinie nicht nachgewiesen werden.

Die Frage, ob die gefundenen Gene in einen Zusammenhang mit der Tumorpromotion nach PKC-Aktivierung zu bringen sind, läßt sich für fünf Gene eindeutig positiv beantworten. IL-8 fördert die für das Tumorstadium notwendige Angiogenese, das MBP-2 verringert durch Down-Regulation des MHC I eine effektive Immunantwort auf die Tumorzellen, das ERM-Gen gehört zu einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die in die Tumorgenese involviert sind, die Methionin-Adenosyltransferase trägt durch ihre allgemein-metabolische Funktion bei Überexpression fördernd zu Zellwachstum und Differenzierung bei und das ect2-Oncogen greift in die Regulation des Zellzyklus ein. Ein weiteres Gen, das in den Zellzyklus eingreift, ist das MPP1, seine genaue Funktion ist jedoch noch unbekannt.

Für den Anstieg von Calpain und den β_2 A-Rezeptor nach PKC-Aktivierung scheinen die Gründe außerhalb der Tumorpromotion zu liegen. Bei beiden Genen werden dadurch Verluste in ihrem Pool ausgeglichen, die direkt oder indirekt durch die PKC entstehen.

Der Anstieg der Expression vom ODC-Antizym 2 und dem Interferon- γ Rezeptor 2 scheinen einer Tumorpromotion eher entgegen zu wirken. Das ODC-Antizym 2 hat einen senkenden Einfluß auf die Polyamin-Biosynthese, der Interferon- γ Rezeptor 2 führt u.a. zu einer verbesserten immunologischen Antwort auf entgleistes Zellwachstum.

In der nachfolgenden Tabelle 18 sind alle Ergebnisse tabellarisch zusammengestellt.

Tabelle 18: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Genname	Genlocus	Anzahl in der Bibliothek	Länge der Übereinstimmungen	Übereinstimmungswert	Max. Überexpression über den Basalwert	Regulierte Zelllinien	bekannte / vermutete Funktion	Regulation bekannt / unbekannt
IL-8	4q12-q13	15	471	0.0	21,2	LN-405 U-87 GAMG	- Angiogenese - Immunregulation	bekannt für Astrozytom-zelllinien
Calpain	1q41-q42	2	233	e-119	5,8	LN-405 U-87	- Regulation PKC-Spiegel - Apoptose	bekannt für Gliome
MBP-2	6q23-q24	1	153	7e-61	7,1	LN-405 U-87 U-138	- Downregulation MHC I - Immunregulation	unbekannt
β₂AR	5q31-q32	1	205	2e-59	6,6	LN-405 U-138	- Signaltransduktion	Downreg. bek. für Astrozytome
MPP1	10q23	1	224	e-124	4,7	LN-405	- Regulation Zellzyklus	unbekannt
Cosmid F0811	6q21.3	1	92	7e-23	12	LN-405 U-87	- keine Aussage möglich	unbekannt
ect2-Oncogen	3q26.1-q26	1	124	2e-57	15,8	LN-405 GAMG	- Onkogen - Regulation Zellzyklus	unbekannt
MAT	2p11.2	1	174	5e-90	3,6	LN-405	- Synthese von Adenosylmet./Polyamine	bekannt für Jurkat-Zellen
PAC-Klon	3p21.3-4	1	45	2e-14	2,5	keine	- nicht PKC-abhängig	—
ERM-Gen	3q27-q29	1	270	e-138	5,4	LN-405 U-138	- Transkriptionsfaktor	unbekannt
PVT	8q21	1	178	e-23	2,8	keine	- nicht PKC-abhängig	—
Metallopanstimulin	1q21	2	85	e-29	1,3	keine	- nicht PKC-abhängig	—
ODC-Antizym 2	15q11.2	1	270	e-132	4,6	LN-405 U-138	- Regulation der Polyaminsynthese	unbekannt
IFN-γ Rezeptor 2	21q22.1-q22.2	1	63	4e-27	44,7	LN-405 U-87 U-138	- Rezeptor für If-γ - Immunregulation	bekannt für Monozyten

5 Zusammenfassung

Die Proteinkinase C (PKC) ist eine wichtige Signaltransduktionskomponente, deren Aktivierung zur Induktion der Expression zahlreicher Gene, zur Zelldifferenzierung und zur Zellproliferation führt. Weiterhin wird angenommen, daß die PKC auch eine wichtige Rolle in der Tumor-promotion spielt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Gene in Astrozytomen zu finden, die nach PKC-Aktivierung differentiell exprimiert werden. Das generell hohe Expressionsniveau der PKC im Hirngewebe, welches zudem von malignen Gliazellen noch übertroffen wird und in Korrelation zu deren Wachstumsgeschwindigkeit steht, führt zu der Erwartung eines besonders deutlich ausgeprägten Einflusses auf die Expression in diesen Zellen.

In einem Nebenversuch wurde untersucht, ob die Stimulation der PKC mit PTHrP eine identische Genexpression hervorruft wie durch Stimulation mit TPA, da auch dem PTHrP eine wichtige Rolle als Wachstums- und Differenzierungsfaktor im Nervengewebe zugeschrieben wird.

Zunächst wurden kultivierte Zellen der Astrozytomzelllinie LN-405 mit TPA bzw. dem PKC-Inhibitor Chelerythrin behandelt. Die verwendeten Konzentrationen von TPA und Chelerythrin entsprachen denen in der Literatur als optimal für die PKC-Aktivierung beschriebenen. Nach Gewinnung der mRNA aus der zuvor isolierten RNA wurden in einem vielschrittigen PCR-Verfahren (PCR-Select) cDNA-Abschnitte gewonnen, die zu vermeintlich differentiell exprimierten Genen gehören. Diese cDNA-Abschnitte wurden in Plasmid-Vektoren eingefügt, kloniert und zur Bestimmung sequenziert. Um falsch positive Sequenzen zu erkennen, wurden die zuvor radioaktiv markierten cDNA-Abschnitte mit Northernblots hybridisiert. Da die RNA auf einem Northernblot aus Ansätzen von in einer Zeitreihe mit TPA, Chelerythrin und PTHrP behandelten Zellkulturen stammte, konnte gleichzeitig ein zeitabhängiger Anstieg der Expression nach TPA-Behandlung nachgewiesen werden. Außerdem wurden weitere Blots zum Nachweis der Expression der einzelnen Gene auch in anderen Astrozytomzelllinien angefertigt.

Durch diese Methoden konnten insgesamt 14 Gene gefunden werden, die in der radioaktiven Northernblot-Hybridisierung überprüft wurden. Drei Gene (Sequenz aus PAC-Klon, Metallopanstimulin, PVT) müssen als falsch positiv gewertet werden, da sie im Northernblot den geforderten Expressionsanstieg um den Faktor drei nicht zeigten. Die anderen 11 Gene sind nach PKC-Aktivierung durch den PCR-Select-Assay richtig als differentiell exprimiert erkannt worden. Dabei bestätigt der gefundene Zusammenhang zwischen PKC-Aktivierung und differentieller Exprimierung bei fünf der 11 positiven Gene (IL-8, Calpain, Interferon- γ Rezeptor 2, MAT, β_2 AR)

Ergebnisse anderer Arbeiten, wobei dieser nur bei zwei Genen (IL-8 und Calpain) auch in Astrozytom- bzw. Gliom-Zellen schon früher gezeigt werden konnte.

Sechs Gene (MPP1, ect2-Onkogen, ERM-Gen, ODC-Antizym 2, MBP-2, Sequenz aus Cosmid F0811) wurden in dieser Arbeit erstmalig als PKC-abhängig exprimiert beschrieben.

Für PTHrP ließ sich kein Zusammenhang mit der Expression oben genannter Gene darstellen.

Die gefundenen Gene haben auf verschiedene Funktionen der Zellen Einfluß. So beeinflussen sie die Regulation des Zellzyklus (MPP1, ect2-Oncogen), die Immunregulation (MBP-2, IL-8, Interferon- γ -Rezeptor), die Signaltransduktion (β_2 AR), die Transkription (ERM-Gen), die Proteinsynthese (ODC-Antizym, MAT), die Wachstumskontrolle (ODC-Antizym) und die Regulation der PKC selbst (Calpain). Für fünf Gene läßt sich ein eindeutiger Zusammenhang mit der Tumorpromotion herstellen: IL-8 (Angiogeneese), MBP-2 (Immunsuppression), ERM (Transkriptions-promotion), MAT (allgemein fördernden Einfluß auf den Metabolismus) und ect2-Oncogen (Oncogen).

6 Literaturverzeichnis

Åkerman, K., Karkola, K. und Kajander, O.:

Methionine adenosyltransferase activity in cultured cells and in human tissues
Biochem. Biophys. Acta, 1097, 140-144, 1991

Angel P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P. und Karin, M.:

Phorbol Ester-Inducible Genes Contain a Common Cis Element Recognized by a TPA-Modulated Trans-Acting Factor
Cell, Vol 49, 729-739, June 19, 1987

Arenberg, D.A., Kunkel, S.L., Polverini, P.J., Glass, M., Burdick, M.D. und Sriter, R.M.:

Inhibition of Interleukin-8 Reduces Tumorigenesis of Human Non-Small Cell Lung Cancer in SCID Mice
J. Clin. Invest., Vol. 97, Number 12, 2792-2802, 1996

Ashendel, C.L.:

The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein kinase
Biochim. Biophys. Acta, Vol. 822, 219-242, 1985

Avruch, J., Zhang, X-f. und Kyriakis, J.M.:

Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway
Trends Biochim. Sci., 19, 279-283, 1994

Azzi, A., Boscobinik, D. und Hensey, C.:

The protein kinase C family
Eur. J. Biochem., 208, 547-557, 1992

Ballester, R. und Rosen O.M.:

Fate of Immunoprecipitable Protein Kinase C in GH₃ Cells Treated with Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
J. Biol Chem., Vol. 260, No. 28, 15194-15199, 1985

- Baltuch, G.H., Dooley, N.P., Couldwell, W.T. und Yong, V.W.:
 Staurosporine differentially inhibits glioma versus non-glioma cell lines
 J. NeuroOnc., 16, 141-147, 1993
- Baltuch, G.H., Dooley, N.P., Villemure, J-G. und Yong, W.:
 Protein Kinase C and Growth Regulation of Malignant Gliomas
 Can. J. Neurol. Sci., 22, 264-271, 1995
- Barboule, N., Lafon, C., Chadebech, P., Vidal, S. und Valette, A.:
 Involvement of p21 in the PKC-induced regulation of the G2/M cell cycle transition
 FEBS Lett., 444, 32-37, 1999
- Belperio, J.A., Keane, M.P., Arenberg, D.A., Addison, C.L., Ehlert, J.E., Burdick, M.D. und
 Strieter, R.M.:
 CXC chemokines in angiogenesis
 J. Leukoc. Biol., 68, 1-8, 2000
- Benveniste, E.N., Vidovic, M., Panek, R.B., Norris, J.G., Reddy, A.T. und Benos, D.J.:
 Interferon- γ -induced Astrocyte Class II Major Histocompatibility Complex Gene Expression
 Is Associated with Both Protein Kinase C Activation and Na⁺ Entry
 J. Biol. Chem., Vol. 266, No. 27, 18119-18126, 1991
- Bouvier, M., Guilbault, N. und Bonin, H.:
 Phorbol-ester-induced phosphorylation of the β_2 -adrenergic receptor decreases its coupling
 to G_s
 FEBS Lett., Vol 279, 243-248, 1991
- Buchner, K.:
 Protein kinase C in the transduction of signal toward and within the cell nucleus
 Eur. J. Biochem., 228, 211-221, 1995

Bunge, A.:

Autokrine Effekte von Parathormon-verwandtem Protein (PTHrP) auf invasionsassoziierte Proteasen in Tumorzelllinien.

Diss., Berlin, Humboldt-Universität, 1997

Burton, P.B.J., Moniz, C. und Knight, D.E.:

Parathyroid hormone related peptide can funktion as an autocrine growth factor in human renal cell carcinoma

Biochem. Biophys. Res. Commun., 167, 1134-1138, 1990

Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. und Nishizuka, Y.:

Direkt Activation of Calcium-activated, Phospholipid-dependent Protein Kinase by Tumor-promoting Phorbol Esters

J. Biol. Chem., Vol. 257, No. 13, Jul 10, 7847-7851, 1982

Chromczynski, P. und Sacchi, N.:

Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction

Analytical Biochemistry, 162, 156-159, 1987

Clemens, M.J., Trayner, I. und Menaya, J.:

The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation

J. Cell Sci., 103, 881-887, 1992

Coffino, P.:

Regulation of Cellular Polyamines by Antizyme

Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2(3): 188-194, 2001

Couldwell, W.T., Uhm, J.H., Antel, J.P. und Yong, V.W.:

Enhanced Protein Kinase C Activity Correlates with the Growth Rate of Malignant Gliomas in Vitro

Neurosurgery, Vol. 29, No. 6, 1991

David-Watine, B., Israël, A. und Kourilsky, P.:

The regulation and expression of MHC class I genes

Immunol. Today, Vol. 11, No. 8, 286-292, 1990

De Blasi, A., Parruti, G. und Sallese, M.:

Regulation of G Protein-coupled Receptor Kinase Subtypes in Activated T Lymphocytes

J. Clin. Invest., Vol. 95, 203-210, 1995

Dekker, L.V., und Parker, P.J.:

Protein kinase C — a question of specificity

Trends Biochem. Sci., 19, 73-77, 1994

De La Rosa, J., Ostrowski, J., Hryniewicz, M.M., Kredich, N.M., Kotb, M., LeGros, H.L., Valentie, M. und Geller, A.M.:

Chromosomal Localization and Catalytic Properties of the Recombinant α Subunit of Lymphocyte Methionine Adenosyltransferase

J. Biol. Chem., Vol. 270, No. 37, 21860-21868, 1995

de Launoit, Y., Baert, J-L., Chotteau, A., Monte, D., Defosse, Coutte, L., Pelczar, H. und Leenders, F.:

Structure-Function Relationship of the PEA3 Group of Ets-Related Transcription Factors

Biochem. Mol. Med., 61, 127-135, 1997

Diatchenko, L., Lau, Y.-F.C., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B.,

Lukyanov, M., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. und Siebert, P.:

Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, pp. 6025-6030, June 1996

Dittmer, J., Pise-Masison, C., Clemens, K.E., Choi, K-S. und Brady, J.N.:

Interaction of T-cell Lymphotropic Virus Type I Tax, Ets1, and Spi1 in Transactivation of the PTHrP P2 Promoter

J. Biol. Chem., Vol. 272, No. 8, 4953-4958, 1997

Emorine, L.J., Marullo, S., Delavie-Klutcho, C., Kaveri, S.V., Durieu-Trautmann, O. und Strosberg, A.D.:

Structure of the gene for human β_2 -adrenergic receptor: Expression and promoter characterization

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84, 6995-6999, 1987

Fan, X-D., Goldberg, M. und Bloom, B.R.:

Interferon- γ -induced transcriptional activation is mediated by protein kinase C

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, 5122-5125, 1988

Farrar, M. A. und Schreiber, R.D.:

The Molecular Cell Biology of Interferon- γ and its Receptor

Annu. Rev. Immunol., 11, 571-611, 1993

Finkenzeller, G., Marmé, D., Weich, H.A. und Hug, H.:

Platelet-derived Growth Factor-induced Transcription of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene Is Mediated by Protein Kinase C

Cancer Research, 52, 4821-4823, 1992

Foletta, V.C.:

Transcription factor AP-1, and the role of Fra-2

Immunology and Cell Biol., 74, 121-133, 1996

Fournier, A. und Murray, A.W.:

Application of phorbol ester to mouse skin causes a rapid and sustained loss of protein kinase C

Nature, Vol. 330, 767-769, 1987

Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A. et al.:

The Minimal Gene Complement of Mycoplasma genitalum

Science, Vol. 270, 397-403, 1995

Fritzler, M.J., Kerfoot, S.M., Feasby, T.E., Zochodne, D.W., Westendorf, J.M., Dalmau, J.O. und Chan, E.K.L.:

Autoantibodies From Patients With Idiopathic Ataxia Bind to M-Phase Phosphoprotein-1 (MPP1)

J. Invest. Med., Vol 48, 28-39, 2000

Funk, J.L., Shigenaga, J.K., Moser, A.H., Krul, E.J.T., Strewler, G.J., Feingold, K.R. und Grunfeld, C.:

Cytokine Regulation of Parathyroid Hormone-Related Protein Messenger Ribonucleic Acid Levels in Mouse Spleen: Paradoxical Effects of Interferon- γ and Interleukin-4

Endocrinology, Vol. 135, 351-358, 1994

Gagnon, L., Jouishomme, H., Whitfield, J.F., Durkin, J.P., MacLean, S., Neugebauer, W., Willick, G., Rixon, R.H. und Chakravarthy, B.:

Protein Kinase C-Activating Domains of Parathyroid Hormone-Related Protein

J. Bone Miner. Res., Apr.8(4): 497-503, 1993

Garcia-Ocaña, A., Gómez-Casero, E., Peñaranda, C. und Esbrit, P.:

Parathyroid Hormone-Related Protein increase DNA Synthesis in Proximal Tubule Cells by Cyclic AMP- and Protein Kinase C-Dependent Pathways.

Life Sciences, Vol. 62, No. 25, 2267-2273, 1998

Gross, V., Zhang, B., Geng, Y., und Villiger, P.:

Regulation of Interleukin-6 (IL-6) Expression: Evidence for a Tissue-Specific Role of Protein Kinase C

Journal of Clinical Immunology, Vol. 13, No.5, 1993

Günther, G. und Otto, B.:

Interferone: Ein Überblick über den gegenwärtigen Stand der Grundlagenforschung mit Schwerpunkt auf dem Interferon- γ

Arzneim.-Forsch./Drug Res., 43(1), Nr.2, 182-188, 1993

Gujral, A., Burton, D., W., Terkeltaub, R. und Deftos, L.J.:

Parathyroid Hormone-related Protein Induces Interleukin-8 Production by Prostate Cancer Cells via a Novel Intracrine Mechanism Not Mediated by its Classical Nuclear Localization Sequence

Cancer Res., 61, 2282-2288, 2001

Guo, J., Iida-Klein, A., Huang, X., Abou-Samra, A., Segre, G.V. und Bringhurst, R.:

Parathyroid Hormon (PTH)/PTH-Related Peptide Receptor Density Modulates Activation of Phospholipase C and Phosphate Transport by PTH in LLC-PK1 Cells

Endocrinology, Vol. 136, No. 9, 1995

Halim, A-B., LeGros, L., Chamberlin, M.E., Geller, A. und Kotb, M.:

Regulation of the Human MAT2A Gene Encoding the Catalytic $\alpha 2$ Subunit of Methionine Adenosyltransferase, MAT II

J. Biol. Chem., Vol. 276, No. 13, 9784-9791, 2001

Halim, A-B., LeGros, L., Geller, A. und Kotb, M.:

Expression and Functional Interaction of the Catalytic and Regulatory Subunits of Human Methionine Adenosyltransferase in Mammalian Cells

J. Biol. Chem., Vol. 274, No. 42, 29720-29725, 1999

Hall, A.G.:

G Proteins and Small GTPases: Distant Relatives Keep in Touch

Science, 280, 2074-2075, 1998

Han, J., Daniel, J.C., Lieska, N. und Pappas, G.:

Immunofluorescence and biochemical studies of the type VI collagen expression by human glioblastoma cells in vitro

Neurol Res, 16, 370-375, 1994

Hashimoto, H., Aino, H., Ogawa, N., Nagata, S. und Baba, B.:

Identification and Characterization of Parathyroid Hormone/Parathyroid Hormone-related Peptide Receptor in Cultured Astrocytes

Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 200, 1042-1048, 1994

Hata, A., Akita, Y., Konno, Y., Suzuki, K. und Ohno, S.:

Direct evidence that the kinase activity of protein kinase C is involved in transcriptional activation through a TPA-responsive element

FEBS Letters, Vol. 252, No. 1,2, 144-146, 1989

Hata, A., Ohno, S. und Suzuki, K.:

Transcriptional activation of the gene for the large subunit of human m-calpain by 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate

FEBS, Vol 304, Nr. 2,3, 241-244, 1992

Hemmi, S., Böhni, R., Stark, G., Di Marco, F. und Aguet, M.:

A Novel Member of the Interferon Receptor Family Complements Functionality of the Murine Interferon- γ -Receptor in Human Cells

Cell, Vol. 76, 803-810, 1994

Herbert, J.M., Augereau, J.M., Gleye, J. und Maffrand, J.P.:

Chelerytrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C

Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 172, 993-999, 1990

Hucho, F. und Buchner, K.:

Signal Transduction and Protein Kinase: The long Way from the Plasma Membrane into the Nucleus

Naturwissenschaften, 84, 281-290, 1997

Hunáková, L., Sedlák, J. und Chorváth, B.:

Phorbol ester-induced modulation of cell surface antigens on U-937 cells in protein-free medium: Effect of protein kinase and calmodulin inhibitors

Neoplasma, 40, 141-146, 1993

Imbra, R.J. und Karin M.:

Phorbol ester induces the transcriptional stimulatory activity of the SV40 enhancer

Nature, Vol 323, 9, 555-558, 1986

Ivanov, I.P., Gesteland, R.F. und Atkins, J.F.:

A Second Mammalian Antizyme: Conservation of Programmed Ribosomal Frameshifting
Genomics, 52, 119-129, 1998

Janknecht, R., Monté, D., Baert, J.-L. und de Launoit, Y.:

The ETS-related transcription factor ERM is a nuclear target of signaling cascades involving
MAPK and PKA
Oncogene, 13, 1745-1754, 1996

Johnson, P.:

Calpains (intracellular Calcium-activated cystein Proteinases): Struktura-activity relationships
and involvement in normal and abnormal cellular Metabolism
Int. J. Biochem., Vol. 22, No. 8, 811-822, 1990

Johnson, M.D., Housey, G.M., O'Brian, C.A., Kirschmeier, P.T., und Weinstein, I.B.:

Role of Protein Kinase C in Regulation of Gene Expression and Relevance to Tumor
Promotion
Environmental Health Perspectives, Vol. 76, 89-95, 1987

Jung, V., Rashidbaigi, A., Jones, C., Tischfield, J.A., Shows, T.B. und Pestka, S.:

Human chromosome 6 and 21 are required for sensitivity to human interferon γ
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84, 4151-4155, 1987

Kawasaki, H. und Kawaschima, S.:

Regulation of the calpain-calpastatin system by membranes (Review)
Mol. Membr. Biol., 13(4), 217-224, 1996

Kelleher, D. J., Pessin, J. E., Ruoho, A. E. und Johnson, G.L.:

Phorbol ester induces desensitization of adenylate cyclase and phosphorylation of the
 β -adrenergic receptor in turkey erythrocytes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 81, 4316-4320, 1984

Kishimoto, A., Mikawa, K., Hashimoto, K., Yasuda, I., Tanaka, S., Tominaga, M., Kuroda, T.
und Nishizuka, Y.:

Limited Proteolysis of Protein Kinase C Subspecies by Calcium dependent Neutral Protease
(Calpain)

J. Biol. Chem., Vol. 264, No. 7, 4088-4092, 1989

Kotb, M. und Geller, A.M.:

Methionine Adenosyltransferase: Structure and Function

Pharmac. Ther., Vol. 59, 125-143, 1993

Kotb, M. und Kredich, N.M.:

S-Adenosylmethionine Synthetase from Human Lymphocytes

J. Biol. Chem., Vol. 260, No. 7, 3923-3930, 1985

Kraft, A.S. und Anderson, W.B.:

Phorbol esters increase the amount of Ca^{2+} , phospholipid-dependent protein kinase
associated with plasma membrane

Nature, Vol. 301, 621-623, 1983

Lampson, L.A., Grabowska, A. und Whelan, J.P.:

Class I and II MHC expression and its implications for regeneration in the nervous system

Prog. Brain Res., Vol. 103, 307-317, 1994

Lampson, L.A. und Hickey, W.F.:

Monoclonal antibody analysis of MHC expression in human brain biopsies: tissue ranging
from "histologically normal" to that showing different levels of glial tumor involvement

J. Immunology, Vol. 136, No. 11, 4054-4062, 1986

Landschulz, W.H., Johnson, P.F., Adashi, E. Y., Graves, B.J. und McKnight, S.L.:

Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP

Genes Dev., 2, 786-800, 1988

Leavitt, M., Setola, V. und Fishman, P.H.:

Protein kinase C-mediated down-regulation of β_2 -adrenergic receptor and gene expression in rat C6 glioma cells

J. Neurochem., 77, 823-829, 2001

LeGros, H.L., Halim, A-B., Geller, A.M. und Kotb, M.:

Cloning, Expression and Functional Characterization of the β Regulatory Subunit of Human Methionine Adenosyltransferase (MAT II)

J. Biol. Chem., Vol. 275, No. 4, 2359-2366, 2000

Liang, P. und Pardee, A.B.:

Differential Display of Eukaryotic Messenger RNA by Means of the Polymerase Chain Reaction

Science, Vol. 257, 967-971, 1992

Liggett, S.B.:

Pharmacogenetics of beta-1- and beta-2-adrenergic receptors

Pharmacology, 61(3), S.167-73, 2000

Liggett, S.B.:

Molecular and genetic basis of β_2 -adrenergic receptor function

J. Allergy. Clin. Immunol., Vol. 104, Number 2, Part 2, 42-46, 1999

Lisitsyn, N., Lisitsyn, N. und Wigler, M.:

Cloning the Differences Between Two Complex Genomes

Science, Vol. 259, 946-951, 1993

Livneh, E. und Fishman, D.D.:

Linking protein kinase C to cell-cyclus control

Eur. J. Biochem., 248, 1-9, 1997

Löffler, G., Petrides, P.E.:

Physiologische Chemie, 4. Auflage,

Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1990

Lukyanov, K.A., Launer, G.A., Tarabykin, V.S., Zarsky, A.G. und Lukyanov, S.A.:

Inverted Terminal Repeats Permit the Average Length of Amplified DNA Fragments to Be Regulated during Preparation of cDNA Libraries by Polymerase Chain Reaction
Analytical Biochemistry, 229, 198-202, 1995

Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J.:

Molecular Cloning, a laboratory manual.
Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, New York, 1982

Martin, T.J. und Suva, L.J.:

Parathyroid hormone-related protein: a novel gene product
Baillieres. Clin. Endocrinol. Metab., 2, 1003-10029, 1988

Martinez-Lacaci I. und Dickson R.B.:

Dual Regulation of the Epidermal Growth Factor Family of Growth Factors in Breast Cancer by Sex Steroids and Protein Kinase C
J. Steroid Biochem. Molec. Biol., Vol. 57, No. 1/2, pp. 1-11, 1996

Matsufuji, S., Matsufuji, T., Miyazaki, Y., Murakami, Y., Atkins, J.F., Gesteland, R.F. und Hayashi, S.:

Autoregulatory Frameshifting in Decoding Mammalian Ornithine Decarboxylase Antizyme
Cell, Vol. 80, 51-60, 1995

Matsumoto-Taniura, N., Pirollet, F., Monroe, R., Gerace, L. und Westendorf, J.M.:

Identification of Novel M Phase Phosphoproteins by Expression Cloning
Mol. Biol. Cell, Vol. 7, 1455-1469, 1996

Miki, T., Smith, C.L., Long, J.E., Eva, A. und Fleming, T.P.:

Oncogene *ect2* is related to regulators of small GTP-binding proteins
Nature, Vol. 362, 462-465, 1993

Mitchell, J. L. A., Judd, G. G., Bareyal-Leyser, A. und Ling, S.Y.:

Feedback repression of polyamine transport is mediated by antizyme in mammalian tissue-culture cells

Biochem. J., Vol. 299, 19-22, 1994

Mobley, P.L., Scott, S.L. und Gruz, E.G.:

Protein kinase C in astrocytes: a determinant of cell morphology

Brain Research, 398, 366-369, 1986

Monté, D., Baert, J.L., Defossez, P.-A., de Launoit, Y. und Stéhelin, D.:

Molecular cloning and characterization of human ERM, a new member of the Ets family closely related to mouse PEA3 and ER81 transcription factors

Oncogene, 9, 1397-1406, 1994

Moseley, J.M., Kubota, M., Diefenbach-Jagger, H., Wettenhall, R.E.H., Kemp, B.E., Suva,

L.J., Rodda, C.P., Ebeling, P.R., Hudson, P.J., Zajac, J.D., und Martin, T.J.:

Parathyroid hormon-related protein purified from a human lung cancer cell line

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 5048-5052, 1987

Murakami, Y., Fujita, K., Kameji, T. und Hayashi, S.:

Accumulation of ornithine decarboxylase-antizyme complex in HMO_A cells

Biochem. J., 225, 689-697, 1985

Murakami, Y., Matsufuji, S., Hayashi, S., Tanahashi, N. und Tanaka, K.:

Degradation of Ornithine Decarboxylase by the 26S Proteasome

Biochem. Biophys. Res. Commun., 267, 1-6, 2000

Murayama, T., Ohara, Y., Obuchi, M., Kahabar, K.S.A., Higashi, H., Mukaida, N. und

Matsushima, K.:

Human Cytomegalovirus Induces Interleukin-8 Production by a Human Monocytic Cell Line, THP-1, through Acting Concurrently on AP-1- and NF- κ B-Binding Sites of the Interleukin-8 Gene

J. Virolol., Vol. 71, No. 7, 5692-5695, 1997

Nakae, K., Nakajima, K., Inazawa, J., Kitaoka, T. und Hirano, T.:

ERM, a PEA3 Subfamily of Ets Transcription Factors, Can Cooperate with c-Jun
J. Biol. Chem., Vol. 270, No. 40, 23795-23800, 1995

Neary, J.T., Norenberg, O.B. und Norenberg, M.D.:

Protein Kinase C in Primary Astrocyte Cultures: Cytoplasmic Localization and Translocation
by a Phorbol Ester
J. Neurochem., Vol. 50, No. 4, 1179-1184, 1988

Nilsson, J., Koskiniemi, S., Persson, K., Grahn, B. und Holm, I.:

Polyamines regulate both transcription and translation of the gene encoding ornithine
decarboxylase antizyme in mouse
Eur. J. Biochem., 250, 223-231, 1997

Nishizuka, Y.:

The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion
Nature, 308, 693-698, 1984

Nishizuka, Y.:

Intracellular Signaling by Hydrolysis of Phospholipids and Activation of Protein Kinase C
Science, Vol. 258, 607-614, 1992

O'Brian, T.G. und Diamond, L.:

Ornithine Decarboxylase Induction and DNA Synthesis in Hamster Embryo Cell Cultures
Treated with Tumor-promoting Phorbol Diesters
Cancer Res., 37, 3895-3900, 1977

Okamoto, S., Mukaida, N., Yasumoto, K., Rice, N., Ishikawa, Y., Horiguchi, H., Murakami, S., und
Matsushima, K.:

The Interleukin-8 AP-1 and κ B-like Sites Are Genetic End Targets of FK506-sensitive
Pathway Accompanied by Calcium Mobilization
J. Biol. Chem., Vol., 269, No. 11, 8582-8589, 1994

Orloff, J.J., Reddy, D., De Papp, A.E., Yang, K.H., Soifer, N.E. und Stewart, A.F.:

Parathyroid Hormone-Related Protein as a Prohormone: Posttranslational Processing and Receptor Interactions

Endocrine Rev., Vol. 15, No 1, 40-60, 1994

Palma, C. und Manzini, S.:

Substance P induces secretion of immunomodulatory cytokines by human astrocytoma cells

J. Neuroimmunology, 81, 127-137, 1998

Parker, P.J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield,

M.D. und Ullrich, A.:

The Complete Primary Structure of Protein Kinase C — the Major Phorbol Ester Receptor

Science, 233, 853-859, 1986

Parney, I.F., Farr-Jones, M., Chang, L-J. und Petruk, K.C.:

Human Glioma Immunobiology in Vitro: Implications for Immunogene Therapy

Neurosurgery, Vol. 46, No. 5, 1169-1178, 2000

Philbrick, W.M., Wysolmerski, J.J., Galbraith, S., Holt, E., Orloff, J.J., Yang, K.H.,

Vasavada, R.C., Weir, E.C., Broadus, A.E. und Stewart, A.F.:

Defining the Roles of Parathyroid Hormone-Related Protein in the Normal Physiology

Physiological Reviews, Vol. 76, No. 1, 1996

Plawner, L.L., Philbrick, W.M., Burtis, W.J., Broadus, A.E. und Stewart, A.F.:

Cell-Type specific Secretion of Parathyroid Hormone-related Protein via the Regulated versus the Constitutive Secretory Pathway

J. Biol. Chem., Vol. 270, 14078-14084, 1995

Pollack, I.F., Randall M.S., Kristofik, M.P., Kelly, R.H., Selker, R.G. und Vertosick, F.T.:

Response of malignant glioma cell lines to activation and inhibition of protein kinase C-mediated pathways

J. Neurosurg., 73, 98-105, 1990

Ray, S.K., Wilford, G.G., Crosby, C.V., Hogan, E.L. und Banik, N.L.:

Diverse stimuli induce calpain overexpression and apoptosis in C6 glioma cells

Brain Res., 829, 18-27, 1999

Restifo, N.P., Kawakami, Y., Marincola, F., Shamamian, P., Taggarse, A., Esquivel, F. und Rosenberg, S.A.:

Molecular Mechanisms Used by Tumors to Escape Immune Recognition:
Immunogenetherapy and the Cell Biology of Major Histocompatibility Complex Class I

J. Immunother., 14, 182-190, 1993

Roebuck, K.A.:

Regulation of Interleukin-8 Gene Expression

J. Interferon Cytokine Res., 19, 429-438, 1999

Rodriguez-Pena, A. und Rozengurt, E.:

Disappearance of Ca^{2+} -sensitive, phospholipid-dependent protein kinase activity in phorbol ester-treated 3T3 cells

Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 120, 1053-1059, 1984

Sakamoto, S., Nie, J. und Taniguchi, T.:

Cutting Edge: Phorbol Ester Induction of IFN- γ Receptor Leads to Enhanced DR α Gene Expression

J. Immunol, Vol. 162, 4381-4384, 1999

Sakamoto, S. und Taniguchi, T.:

Identification of a Phorbol Ester-responsive Element in the Interferon- γ Receptor 1 chain Gene

J. Biol. Chem., Vol. 276, No. 40, 37237-37241, 2001

Sakata, H., Rubin, J.S., Taylor, W. und Miki, T.:

A Rho-Specific Exchange Factor Ect2 Is Induced From S to M Phases in Regenerating Mouse Liver

Hepatology, Vol. 32, 193-199, 2000

Shtivelman, E., Henglein, B., Groitl, P., Lipp, M. und Bishop, J.M.:

Identification of a human transcription unit affected by the variant chromosomal translocation 2;8 and 8;22 of Burkitt lymphoma

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 86, 3257-3260, 1989

Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A. und Lukyanov, S.A.:

An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA

Nucleic Acids Res., 23, 1087-1088, 1995

Stiles, G.L., Strasser, R.H., Lavin, T.N., Jones, L.R., Caron, M.G. und Lefkowitz, R.J.:

The Cardiac β -adrenergic Receptor

J. Biol. Chem., Vol. 258, 8443-8449, 1983

Smith, D.R., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Orringer, M.B., Whyte, R.I., Burdick, M.D., Wilke, C.A. und Strieter, R.M.:

Inhibition of Interleukin-8 Attenuates Angiogenesis in Bronchogenic Carcinoma

J. Exp. Med., Vol. 179, 1409-1415, 1994

Soh, J., Donnelly, R.J., Kotenko, S., Mariano, T.M., Cook, J.R., Wang, N., Emanuel, S., Schwartz, B., Miki, T. und Pestka, S.:

Identification and Sequence of an Accessory Factor Required for Activation of the Human Interferon γ Receptor

Cell, Vol. 76, 793-802, 1994

Struckhof, G. und Turzynski, A.:

Demonstration of parathyroid hormone-related protein in meninges and its rezeptor in astrocytes: evidence for a paracrine meningo-astrocytic loop

Brain Res., 676, 1-9, 1995

Sugimoto, T., Kano, J., Yamaguchi, T., Fukase, M. und Chihara, K.:

Role of Calcium/Protein Kinase C in the Regulation of DNA Synthesis by Parathyroid Hormone-Related Peptide in Osteoblastic Osteosarcoma Cells

Horm. metab. Res., Vol. 25, 608-611, 1993

Suzuki, K., Saido, T. C., und Hirari, S.:

Modulation of Cellular Signals by Calpain

Ann NY Acad Sci, Vol. 674, 218-227, 1992

Suzuki, K. und Sorimachi, H.:

A novel aspect of calpain activation

FEBS Lett., Vol. 433, 1-4, 1998

Tabor, C.W. und Tabor, H.:

Polyamines

Ann. Rev. Biochem., Vol. 53, 749-790, 1984

Tanka, C. und Nishizuka Y.:

The protein kinase C family for neuronal signaling

Ann. Rev. Neurosci., 17, 551-567, 1994

Tatsumoto, T., Xie, X., Blumenthal, R., Okamoto, I. und Miki, T.:

Human ECT2 Is an Exchange Factor for Rho GTPases, Phosphorylated in G2/M Phases, and Involved in Cytokinesis

J. Cell. Biol., Vol. 147, Nr. 5, 921-927, 1999

Ting, F.P-Y. und Baldwin, A.S.:

Regulation of MHC gene expression

Curr. Opin. Immunol., 5, 8-16, 1993

Tobena, R., Horikawa, S., Calvo, V. und Alemany, S.:

Interleukin-2 induces γ -S-adenosyl-L-methionine synthetase gene expression during T-lymphocyte activation

Biochem. J., 319, 929-933, 1996

Tseng, C-P., Kim, Y-J., Kumar, R. und Verma, A.K.:

Involvement of protein kinase C in the transcriptional regulation of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-inducible genes modulated by AP-1 or non-AP-1 transacting factors

Carcinogenesis, Vol 15, No. 4, 707-711, 1994

Van't Veer, L.J., Lutz, P.M., Isselbacher, K.J. und Bernards, R.:

Structure and expression of major histocompatibility complex-binding protein 2, a 275-kDa zinc finger protein that binds to an enhancer of major histocompatibility complex class I genes

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 89, 8971-8975, 1992

Veltri, R.W., Miller, M.C., Zhao, G., Ng, A., Marley, G.M., Wright, G.L., Vessella, R.L.:

und Ralph, D.:

Interleukin-8 serum levels in patient with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer

Urology, 53, 139-47, 1999

Villanueva-Peñacarrillo, M.L., Cancelas, J., De Miguel, F., Redondo, A., Valin, A., Valverde,

I. und Esbrit, P.:

Parathyroid hormone-related peptide stimulates DNA synthesis and insulin secretion in pancreatic islets

J. Endocrinology, 163, 403-408, 1999

Westendorf, J.M., Rao, P.N. und Gerace, L.:

Cloning of cDNAs for M-phase phosphoproteins recognized by the MPM2 monoclonal antibody and determination of the phosphorylated epitope

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, 714-718, 1994

Wetsel, W.C., Khan, W.A., Merchenthaler I., Rivera, H., Halpern, A.E., Phung, H.M.,

Negro-Vilar, A. und Hannun, Y.A.:

Tissue and Cellular Distribution of the Extended Family of Protein Kinase C Isoenzymes

J. Cell Biol., Vol. 117, 121-133, 1992

Whitfield, J.F., Chakravarthy, B.L., Durkin, J.P., Isaacs, R.J., Jouishomme, H., Sikorska, M., Williams, R.E. und Rixon, R.H.:

Parathyroid Hormone Stimulates Protein Kinase C but Not Adenylate Cyclase In Mouse Epidermal Keratinocytes

J. Cell. Physiol., 150, 299-303, 1992

Whitfield, J.F., Isaacs, R.J., Chakravarthy, B.L., Durkin, J.P., Morley, P., Neugebauer, W., Williams, R.E., Willick, G. und Rixon, R.H.:

C-Terminal Fragment of Parathyroid Hormone-Related Protein, PTHrP-(107-111) and (107-139), and the N-Terminal PTHrP-(1-40) Fragment Stimulate Membrane-Associated Protein Kinase C Activity in Rat Spleen Lymphocytes

J. Cell Physiol., 158, 518-522, 1994

Whitfield, J.F., Isaacs, R.J., Jouishomme, H., MacLean, S., Chakravarthy, B.L., Morley, P., Barisoni, D., Regalia, E. und Armato, U.:

C-Terminal Fragment of Parathyroid Hormone-Related Protein, PTHrP-(107-111), Stimulates Membrane-Associated Protein Kinase C Activity and Modulates the Proliferation of Human and Murine Skin Keratinocytes

J. Cell. Physiol., 166, 1-11, 1996

Wong, B.R., Park, C.G., Lee, S.Y. und Choi, Y.:

Identifying T-Cell Signaling Molecules with the Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit Clontechniques XI(3): 32-33, 1996

Yamaguchi, K., Ogita, K., Nakamura, S. und Nishizuka, Y.:

The Protein Kinase C Isoforms leading to MAP-Kinase Activation in CHO Cells

Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 210, No.3, 639-647, 1995

Yoneda, J., Kuniyasu, H., Crispens, M.A., Price, J.E., Bucana, C.D., Fidler und I.J.:

Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice

J. Natl. Cancer Inst., 90, 447-454, 1998

Yong, V.W.:

Proliferation of human and mouse astrocytes in vitro: signalling through the protein kinase C pathway

J. Neurological Sciences, 111, 92-103, 1992

Yu, D., Seitz, P.K., Selvanayagam, P., Rajaraman, S., Townsend, C.M. und Cooper, C.W.:

Effects of Parathyroid Hormone-Related Peptide on Adenosine 3', 5'-Monophosphate and Ornithine Decarboxylase in a Human Colonic Cell Line

Endocrinology, Vol. 130, No. 4, 1993-2000, 1992

Yuspa, S.H., Lichti, U., Ben, T., Patterson, E., Hennings, H., Slaga, T.J., Colburn, N. und Kelsey, W.:

Phorbol esters stimulate DNA synthesis and ornithine decarboxylase activity in mouse epidermal cell cultures

Nature, Vol. 262, 402-404, 1976

Zeng, J., Gorski, R.A. und Hamer, D.:

Differential cDNA cloning by enzymatic degrading subtraction (EDS)

Nucleic Acids Research, Vol. 22, No. 21, 4381-4385, 1994

Zeng, Z., Yang, H., Huang, Z-Z-, Chen, C., Wang, J. und Lu, S.C.:

The role of c-Myb in the up-regulation of methionine adenosyltransferase 2A expression in activated Jurkat cells

Biochem. J., 353, 163-168, 2001

Zhu, C., Lang, D.W. und Coffino, P.:

Antizyme2 Is a Negative Regulator of Ornithine Decarboxylase and Polyamine Transport

J. Biol. Chem. Vol. 274, No. 37, 26425-26430, 1999

Eidesstattliche Versicherung

Belehrt über die Strafbarkeit einer auch nur fahrlässig falschen Versicherung an Eides Statt
versichere ich an Eides Statt:

Ich heiße: Timm Schulz

geb. am: 27. Juli 1970

wohnhafte: Lauterberger Str. 35, 12347 Berlin

Ich versichere hiermit, daß ich die der Medizinischen Fakultät Charité vorgelegte
Dissertationsschrift:

„Nachweis Proteinkinase C abhängig exprimierter Gene in Astrozytomen“

selbständig angefertigt habe, die Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer oder eigener Arbeiten
darstellt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden.

Ich habe und hatte bisher kein Promotionsverfahren an anderer Stelle beantragt.

Mir ist bewußt, daß eine nicht wahrheitsgemäße eidesstattliche Versicherung erhebliche
strafrechtliche Konsequenzen für mich haben kann.

Berlin, den 24.02.2003

Unterschrift

Curriculum vitae

von

Timm Schulz

geboren am 27. Juli 1970 in Wuppertal

Schulbildung

13.06.1991 Abitur am Städtischen Gymnasium an der Bayreuther Straße
in Wuppertal

Zivildienst

07 / 1991-09 / 1992 Krankenpflege auf einer neurochirurgischen Station, Bethesda
Krankenhaus Wuppertal

Hochschulbildung

WS 1992/93-2000 Studium der Humanmedizin
an der Humboldt-Universität zu Berlin

03 / 1996 Ärztliche Vorprüfung
09 / 1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03 / 1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10 / 1999-09 / 2000 Praktisches Jahr
11 / 2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04 / 2002 Beginn AiP in der Klinik für Neurochirurgie der Humboldt-
Universität zu Berlin, Campus Virchow-Klinikum

Promotion

Beginn der Promotion im Juni 1996 am Institut für Pathologie der
Humboldt-Universität zu Berlin, Campus Charité Mitte
Doktorvater: Prof. Dr. Manfred Dietel
Betreuer: Dr. Andeas Turzynski
Thema: Nachweis Proteinkinase C abhängig exprimierter Gene in
Astrozytomen

Danksagung

An erster Stelle danke ich meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglichten.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Manfred Dietel und Dr. Andreas Turzynski für die Überlassung des interessanten Themas sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Sachmittel.

Desweiteren danke ich Dr. Andreas Turzynski für die Betreuung während der experimentellen Phase und für die Einführung in die Arbeit mit Zellkulturen und den molekularbiologischen Arbeitstechniken.

Ganz besonders großen Dank schulde ich meinem Kommilitonen Dr. Martin Schultz für die gute Zusammenarbeit, die stete Diskussionsbereitschaft und die unermütlche Hilfe bei Problemen der Computertechnik.

Des weiteren gilt mein Dank den Mitarbeitern des Pathologischen Instituts für ihre Unterstützungen. Besonders nennen möchte ich Dr. Christiane Sers, Dr. Simone Petersen, Dr. Andreas Bunge, PD Dr. Kai Wiechen, Dr. Gabriele Saretzki, Dr. Hermann Lage und Dr. Ursula Anderer.

Für das Korrekturlesen der Promotionsschrift danke ich meinem Vater, meinem Kommilitonen Dr. Martin Schultz und meinem Freund Daniel Reichelt.